



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *in vitro*
DE EXTRACTOS DE *Passiflora manicata* (Juss.) Pers.**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: SANTAMARÍA TAPIA STALIN ARMANDO

RIOBAMBA-ECUADOR

2016



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *in vitro* DE EXTRACTOS DE *Passiflora manicata* (Juss.) Pers.

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: SANTAMARÍA TAPIA STALIN ARMANDO

TUTOR: BQF. DIEGO RENATO VINUEZA TAPIA M. Sc.

RIOBAMBA-ECUADOR

2016

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Stalin Armando Santamaría Tapia, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 18 de Enero del 2016.

Stalin Armando Santamaría Tapia

060423832-9

©**2016**, Stalin Armando Santamaría Tapia.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA *in vitro* DE EXTRACTOS DE *Passiflora manicata* (Juss.) Pers.”**, de responsabilidad del señor Stalin Armando Santamaría Tapia, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Renato Vinueza Tapia M. Sc.

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dra. Susana Abdo.

MIEMBRO DE TRIBUNAL

NOTA DE TESIS ESCRITA

Yo, Stalin Armando Santamaría Tapia, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Documento; y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

.....

STALIN ARMANDO SANTAMARÍA TAPIA

DEDICATORIA

Este trabajo de Titulación va dedicado a las personas que considero más importantes en mi vida, que con su amor y comprensión siempre me han apoyado incondicionalmente. A mis padres por sus consejos, valores, guiarme y apoyarme durante toda mi vida. A mi esposa por ser la fuente de motivación, mi amiga y compañera inseparable. A mi hijo por ser mi inspiración y fortaleza para no rendirme nunca y cumplir este sueño tan anhelado.

Stalin

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por darme salud y vida para permitirme llegar a dicho momento en mi vida. A mis queridos padres Jaime y Marcia por su apoyo incondicional, y guiarme en mi preparación profesional. A mí amada esposa Andrea, por ser la fuente de inspiración y amor en los momentos más difíciles. A mí amado hijo Nicolás, por ser el motor de fuerza y razón de luchar. A mi hermana Evelyn por su confianza. A mis familiares, suegros y allegados por su colaboración desinteresada en todo momento y todos quienes de alguna forma aportaron con el desarrollo de la presente investigación. A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por los conocimientos adquiridos en mi formación académica. Al BQF. Diego Vinuesa y Dra. Susana Abdo por su valiosa contribución y asesoramiento en la dirección del presente trabajo de titulación.

Stalin

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	Páginas
<u>RESUMEN.....</u>	<u>XVI</u>
<u>ABSTRACT.....</u>	<u>XVII</u>
<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>1</u>
<u>CAPITULO I.....</u>	<u>4</u>
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Antecedentes del estudio.....	4
1.2. Luz solar.	5
1.3. Radiación Ultravioleta.	5
1.4. Tipos de radiación UV.....	6
1.5. Cantidad de radiación UV recibida.....	7
1.6. Fotobiología cutánea.....	7
1.7. Fototipos cutáneos.	8
1.8. Efectos de la radiación solar en la piel.....	9
1.9. Fotodermatosis.....	9
1.10. Cáncer de piel.....	10
1.11. Tipos de cáncer de piel.....	11
1.11.1. Carcinoma de células basales.....	11
1.11.2. Carcinoma de células escamosas.....	12
1.11.3. Melanoma.	12
1.12. Fotoprotección.	13
1.13. Fotoprotección natural de la piel.....	13

1.14.	Filtros solares.	14
1.15.	Clasificación de los Filtros Solares.	14
1.15.1.	Filtros Físicos.	14
1.15.2.	Filtros Químicos.	14
1.15.3.	Filtros Biológicos.	14
1.16.	Factor de protección Solar (SPF).	14
1.17.	Antioxidantes.	15
1.18.	Antioxidantes naturales.	15
1.19.	Flavonoides en plantas y su función.	17
1.20.	Flor de la pasión (<i>Passiflora manicata</i> (Juss.) Pers.).....	17
1.21.	Descripción botánica.....	18
1.22.	Origen y distribución.	18
1.23.	Propiedades terapéuticas.....	18

CAPITULO II 19

2. MARCO METODOLÓGICO 19

2.1.	Lugar de la Investigación.	19
2.2.	Recolección del Material Vegetal.	19
2.3.	Identificación Botánica y Taxonómica.	19
2.4.	Determinación del Contenido de Humedad.	19
2.5.	Determinación de Cenizas Totales.....	20
2.6.	Determinación de Cenizas Solubles en Agua.	21
2.7.	Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico.	22
2.8.	Screening Fitoquímico.	23
2.9.	Análisis Físicoquímicos Cualitativos 24	24
2.9.1.	Reacciones de Caracterización.....	24
2.10.	Obtención del Extracto EtOH y Subextractos de <i>Passiflora manicata</i> (Juss.) Pers... 25	25

2.11.	Determinación del contenido de Fenoles Totales.....	26
2.12.	Determinación del contenido de Flavonoides Totales.	26
2.13.	Determinación de Factor de Protección Solar (SPF) in vitro.....	27
2.14.	Efecto protector contra la radiación UV-B de la muerte celular inducida.	28

CAPITULO III..... 29

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS..... 29

3.1.	Análisis, interpretación y discusión de resultados.	29
3.1.1.	Determinación del Contenido de Humedad.	29
3.1.2.	Determinación de Cenizas Totales.....	29
3.1.3.	Determinación de Cenizas Solubles en Agua.	29
3.1.4.	Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico.	30
3.1.5.	Screening Fitoquímico.	30
3.1.6.	Rendimiento y cantidad de los Subextractos de <i>Passiflora manicata</i> (Juss.) Pers.....	31
3.1.7.	Análisis Cualitativo de los Grupos Fitoquímicos por TLC (Cromatografía en Capa Fina)	31
3.1.8.	Determinación del contenido de Fenoles Totales.....	32
3.1.9.	Determinación del contenido de Flavonoides Totales.	33
3.1.10.	Determinación del Factor de Protección Solar (SPF) in vitro.....	34
3.1.11.	Efecto protector contra la radiación UV-B de la muerte celular inducida	37
3.2.	Pruebas de hipótesis.	38
3.2.1.	Los extractos de <i>Passiflora manicata</i> contienen compuestos fenólicos y flavonoides.	38
3.2.1.	Los extractos de <i>Passiflora manicata</i> presentan un factor de protección solar (SPF) in vitro mayor al factor mínimo de protección solar.	38
3.2.3.	Los extractos de <i>Passiflora manicata</i> otorgan fotoprotección a cepa de <i>Escherichia coli</i> de la radiación UV-B.	39

3.3.	Presentación de resultados.	41
3.3.1.	Determinación del Contenido de Humedad.	41
3.3.2.	Determinación de Cenizas Totales.	41
3.3.3.	Determinación de Cenizas Solubles en Agua.	41
3.3.4.	Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico.	41
3.3.5.	Screening Fitoquímico.	42
3.3.6.	Rendimiento y Cantidad de los Subextractos de <i>Passiflora manicata</i>	43
3.3.7.	Análisis Cualitativo de los Grupos Fitoquímicos por TLC (Cromatografía en Capa Fina).	44
3.3.8.	Determinación del contenido de Fenoles Totales.	44
3.3.9.	Determinación del contenido de Flavonoides Totales.	45
3.3.10.	Determinación del Factor de Protección Solar (SPF) in vitro.	45
3.3.11.	Efecto protector contra la radiación UV-B de la muerte celular inducida.	49
	CONCLUSIONES	54
	RECOMENDACIONES	55
	BIBLIOGRAFÍA	1
	ANEXOS	8

INDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1-1: La radiación electromagnética según la longitud de onda.....	6
Tabla 2-1: Fototipos cutáneos (SPT).	8
Tabla 3-1: Clasificación del Factor de Protección Solar (SPF) (COLIPA).	15
Tabla 7-3: Extractos con su correspondiente Rf y metabolito identificado.	31
Tabla 8-3: Concentración de Fenoles y Flavonoides Totales.	38
Tabla 9-3: Valores de SPF de los diferentes extractos de <i>Passiflora manicata</i>	38
Tabla 1-3: Resultados de la Humedad \pm DE.	41
Tabla 2-3: Resultados de Cenizas Totales \pm DE.	41
Tabla 3-3: Resultados de Cenizas Solubles en Agua \pm DE.	41
Tabla 4-3: Resultados de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico en Agua \pm DE.	41
Tabla 5-3: Resultados del Screening Fitoquímico.	42
Tabla 6-3: Resultados del rendimiento de los subextractos objeto de estudio.	43
Tabla 8-3: Resultados del perfil cromatográfico visto por UV.	44
Tabla 9-3: Resultados de la concentración de Fenoles Totales.	44
Tabla 10-3: Resultados de la concentración de Flavonoides Totales.	45
Tabla 11-3: Resultados del SPF otorgado por el subextracto hexánico.	45
Tabla 12-3: Resultados del SPF otorgado por el subextracto clorofórmico.	46
Tabla 13-3: Resultados del SPF otorgado por el subextracto con acetato de etilo.	47
Tabla 14-3: Resultados del SPF otorgado por el subextracto etanólico.	48
Tabla 15-3: Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subextracto hexánico.	49
Tabla 16-3: Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subext. Clorofórmico.	50
Tabla 17-3: Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subext. Acetato de etilo.	51
Tabla 18-3: Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subextracto etanólico.	52
Tabla 19-3: Controles negativos (Hexano, Cloroformo, Acetato de Etilo y Etanol).	53

INDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1-1: Penetración de la radiación UV en la piel.....	9
Figura 2-1: Clasificación de la fotodermatosis.	10
Figura 3-1: Efectos inmunosupresores de la radiación UV en la piel.....	12
Figura 4-1: Ácidos antioxidantes fenólicos.	16
Figura 5-1: Antioxidantes flavonoides.	17
Figura 6-1: <i>Passiflora manicata</i> (Juss.) Pers.	17
Figura 1-2: Técnica para el tamizaje Fitoquímico.	23
Figura 2-2: Técnica para el tamizaje Fitoquímico extracto etéreo.....	24
Figura 3-2: Técnica para el tamizaje Fitoquímico extracto acuoso.	25
Figura 4-2: Los valores de EE X I.....	27
Figura 1-3: Curva de calibración del Ácido Gálico.	32
Figura 2-3: Comparativa de la Cantidad de Fenoles Totales entre subextractos.	33
Figura 3-3: Curva de calibración de Quercetina.	34
Figura 4-3: Comparativa de la Cantidad de Flavonoides Totales entre subextractos.	34
Figura 5-3: Diagrama de Comparativo Medias (SPF) \pm DE.....	36
Figura 6-3: Histograma de los subextractos.....	36
Figura 7-3: Fotoprotección celular del subextracto hexánico.	39
Figura 8-3: Fotoprotección celular del subextracto clorofórmico.	39
Figura 9-3: Fotoprotección celular del subextracto con acetato de etilo.	40
Figura 10-3: Fotoprotección celular del subextracto etanólico.....	40
Figura 11-3: Comparativa del subextracto hexánico vs (ESTÁNDAR 1 y 2) a 2000 ppm.	49
Figura 12-3: Comparativa del subextracto clorofórmico vs (ESTÁNDAR 1 y 2) a 2000 ppm.	50
Figura 13-3: Comparativa del subextracto acetato de etilo vs (ESTÁNDAR 1 y 2) a 2000 ppm.	51
Figura 14-3: Comparativa del subextracto etanólico vs (ESTÁNDAR 1 y 2) a 2000 ppm.	52
Figura 15-3: Comparativa del subextracto etanólico vs (ESTÁNDAR 1 y 2) a 2000 ppm.	53

INDICE DE ANEXOS

Anexo A.	Control de Calidad del vegetal
Anexo B.	Screening Fitoquímico
Anexo C.	Absorbancias para curva de calibración del ácido gálico
Anexo D.	Espectro de absorción para la curva de calibración de Quercetina
Anexo E.	Absorbancias para curva de calibración de Quercetina
Anexo F.	Análisis estadístico del SPF
Anexo G.	Estudio de Niveles de SPF <i>in vitro</i> en protectores solares comerciales
Anexo H.	Preparación del Estándar Mc. Farland
Anexo I.	Cuantificación de flavonoides y fenoles totales
Anexo J.	Verificación de absorbancias para determinar SPF
Anexo K.	Preparación de agar Mueller Hinton y cultivo de <i>Escherichia coli</i> a diferentes tiempos de irradiación UV-B
Anexo L.	<i>Escherichia coli</i> al cultivarse minutos después de irradiarse con UV-B, Estándar Pamidato-O (P-O) y Octilmetoxicinamato (OMC); Subextracto Hexánico (H), Clorofórmico (C) y con Acetato de etilo (Ac. E.)

RESUMEN

El presente trabajo de titulación evaluó la actividad fotoprotectora de extractos de *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de productos naturales y clínico bacteriológico de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, para comprobar la presencia de compuestos fenólicos se realizó un screening fitoquímico cualitativo. Se determinó el contenido de flavonoides y fenoles por el método de cloruro de aluminio y Colin-Ciocalteu respectivamente. Seguido se calculó el Factor de Protección Solar (FPS) *in vitro* por el método espectrofotométrico desarrollado por Mansur, posteriormente la actividad fotoprotectora contra radiación ultravioleta UV-B por muerte celular inducida mediante exposición a diferentes tiempos y concentraciones de extracto utilizando *Escherichia coli*. El screening fitoquímico demostró la presencia de lactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides, grasas, azúcares reductores, saponinas, fenoles, taninos, flavonoides y antocinidinas. Los contenidos fenólicos y flavonoides totales en mayor proporción fueron $14,21 \pm 0,19$ mg de equivalentes de Ácido Gálico/g y $11,96 \pm 0,07$ mg de equivalentes de Quercetina/g respectivamente para el subextracto etanólico. Los extractos de *Passiflora manicata*. Mostraron bandas de absorción en el Ultravioleta-B con el mayor (SPF) Factor de Protección Solar *in vitro* $23,76 \pm 0,0065$ que corresponde a la fracción de etanol a 2000 ppm y a su vez otorgo la mayor fotoprotección a las colonias de *Escherichia coli* irradiadas con luz ultravioleta-B. Finalmente, *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. se puede utilizar como fotoprotector en formulaciones farmacéuticas, cosmeceúticas y/o cosméticas a futuro.

Palabras clave: <[FLOR DE LA PASIÓN] *Passiflora manicata* (Juss.) Pers.>, <[FACTOR DE PROTECCION SOLAR]>, <[RADIACIÓN ULTRAVIOLETA UV-B]>, <[ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA]>, <[MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO]>, <[BACTERIA INTESTINAL] *Escherichia coli*>.

ABSTRACT

The present work evaluated the photo protective activity of extracts of *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. The study was carried out in order at laboratories of natural and clinical bacteriological products of Escuela Superior Politécnica de Chimborazo to find out the presence of phenolic compounds by performing a qualitative phytochemical screening. It determined the content of flavonoids and phenols through the method aluminum chloride and Colin-Ciocalteu respectively. After that it calculated the Sun Protection Factor (SPF) in vitro with the spectrophotometric method, developed by Mansur, and then the photoresist activity against ultraviolet radiation UV-B induced by cell death, trough exposure at different times and concentrations of extract using *Escherichia coli*. The phytochemical screening showed the presence of lactones, coumarins, triterpenes and steroids, fats, reducing sugars, saponins, phenol, tannins, flavonoids and anthocyanidins. The phenolic contents and total flavonoids in greater proportion were $14,21 \pm 0,19$ mg equivalents of Gallic acid/g and $11,96 \pm 0,07$ mg equivalents of Quercetin/g for ethanol extract respectively. The *Passiflora manicata* extracts showed absorption bands in the UV-B with the highest Sun Protection Factor (SPF) $23,76 \pm 0,0065$ in vitro, which corresponds to the ethanol fraction to 20 ppm and at the same time it provided more photo protection toward *Escherichia coli* colonies that were irradiated with ultraviolet UV-B at a concentration of 2000 ppm. Finally *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. can be used as sunscreen in pharmaceutical formulations, cosmeceutical and/or cosmetic for future.

Keywords: <[PASSION FLOWER] *Passiflora manicata* (Juss.) Pers.>, <[SUN PROTECTION FACTOR]>, <[ULTRAVIOLET RADIATION UV-B]>, <[PHOTO PROTECTIVE ACTIVITY]>, <[SPECTROPHOTOMETRIC METHOD]>, <[INTESTINAL BACTERIA] *Escherichia coli*>.

INTRODUCCIÓN

La constante degradación de la capa de ozono por la contaminación, provoca que la tierra se vea afectada por la radiación, debido a que los rayos solares atraviesan la capa de ozono de forma más directa. Ecuador, al estar ubicado en la zona geográfica ecuatorial, recibe dicha radiación con mayor intensidad, además factores como la altura, reflexión del suelo y la poca nubosidad promueven aún más la intensidad de radiación. (Puentes, O. y otros. 2002)

Así mismo, la radiación que emite la luz solar es el principal agente causante de muchas patologías de la piel tales como: envejecimiento prematuro de la piel, eritemas, hiperplasias, pigmentación cutánea, cáncer de piel, estrés oxidativo e incluso alteración en el ADN, debido a que la radiación penetra en la epidermis y/o dermis de las personas, provocando cambios a nivel celular por la generación de radicales libres. (De-Grujil, F. y otros. 1994)

En Ecuador, el cáncer más frecuente que afecta a las personas es el cáncer de piel no melanoma, adicionalmente este tipo de cáncer se encuentra en el 2do lugar entre las causas de fallecimiento por cáncer actualmente, llegando en el año 2010 a una tasa de mortalidad de 64,22 personas de cada 100.000 habitantes (Ministerio de Salud Pública, 2013.), siendo el carcinoma de células basales de mayor porcentaje (65.1%) con respecto al carcinoma de células escamosas (21.3%). (SOLCA, 2014)

Dichas patologías en la actualidad muestran un aumento, debido a que la exposición a la radiación cada vez es mayor, cabe recalcar, que la población más afectada por este tipo de radiación son las personas de test blanca y albina, ya que su fototipo de piel impide que la melanina proteja su dermis causando graves daños.

Por lo tanto, el cáncer de piel constituye un problema de salud pública y la población ecuatoriana es más propensa a sufrir patologías relacionadas con la piel a causa de la radiación solar. (Goncalves, otros, 2013.)

Entre las radiaciones responsables de estos trastornos tenemos a la radiación ultravioleta UV-A y UV-B, la radiación UV-A actúa sobre la epidermis y dermis principalmente y la radiación UV-B es la causante en su mayor parte del cáncer de piel ya que la radiación UV-C es absorbida por la capa de ozono totalmente. (Goncalves, otros, 2013.)

Entonces, es de vital importancia contribuir de alguna manera en la prevención del cáncer de piel en la población ecuatoriana y así, mejorar el estilo y calidad de vida de las personas.

Ventajosamente, Ecuador posee una variedad asombrosa de especies vegetales (cerca de 20.000 especies), de las cuales el 20% son autóctonas (Cerón, 2003), que a través del tiempo han desarrollado mecanismos de protección para contrarrestar estas radiaciones, por medio de síntesis de sustancias llamadas metabolitos con propiedades que pueden ayudar a prevenir este tipo de trastornos.

Entre los metabolitos de mayor importancia frente a la radiación ultravioleta tenemos a los compuestos fenólicos, flavonoides y antioxidantes. Por este motivo, dicha investigación pretende valorar la actividad fotoprotectora que puede ejercer dichos metabolitos frente a la luz UV de una manera experimental.

El grupo de estudio se basó en el género *Passiflora* denominadas comúnmente como Pasifloras, distribuidas ampliamente por zonas tropicales y subtropicales del Ecuador, entre este grupo de especies vegetales la *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. es la planta utilizada en dicha investigación por sus propiedades antioxidantes y sus compuestos fenólicos (Jiménez, 2010.), y así demostrar la efectividad de una especie vegetal autóctona de la sierra ecuatoriana conocida comúnmente como Flor de la Pasión.

En así, que la presente investigación pretende evaluar la capacidad fotoprotectora de extractos de *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. frente a la radiación simulada UV-B de una lámpara de luz, además mediante dicha absorción de luz se medirá la transmitancia generada de las sustancias y el factor de protección solar en cada uno de los extractos.

Finalmente, dicho estudio es viable y de vital importancia porque la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo cuenta con la infraestructura y equipos necesarios para ejecutar dicha investigación y de esta manera promover la fabricación de productos que ayuden a combatir los trastornos relacionadas con la piel, también colaborar con el cambio de la matriz productiva de Ecuador al promover el cultivo de *Passiflora manicata* en el agricultura y elaboración de fitofármacos, cosmeceúticos con un filtro solar natural.

Objetivos

Objetivo general.

- ✓ Evaluar la actividad fotoprotectora *in vitro* de extractos de *Passiflora manicata* (Juss.) Pers.

Objetivos específicos.

- ✓ Ejecutar el screening fitoquímico de los extractos de *Passiflora manicata* (Juss.) Pers.
- ✓ Determinar el factor de protección solar *in vitro* de los extractos de *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. tratados con radiación UV-B por espectrofotometría.
- ✓ Investigar el efecto fotoprotector de los extractos de *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. a través de una muerte celular inducida por radiación UV-B a cepas de *Escherichia coli*.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes del estudio.

Antiguamente los trastornos relacionados con la piel no eran tan comunes, debido a que la población tenía menos exposición a la radiación, la alimentación era diferente, usaban sombrero y prendas de vestir de color claro y fabricadas en algodón, además no existían cámaras de bronceado es decir, su estilo de vida conservador permitía mantener hasta cierto punto controlado este tipo de enfermedades.

Pero con el pasar del tiempo se evidencia un aumento de este tipo de patologías debido a la destrucción de la capa de ozono, el aparecimiento de las cámaras de bronceado, la mala alimentación, la continua exposición a la radiación solar y el estereotipo humano de llevar un cuerpo bronceado como símbolo de belleza, sin duda han provocado un incremento en las afecciones de la piel en estos tiempos.

Actualmente, el aumento de los casos de envejecimiento de la piel, carcinomas, melanomas, eritemas, pigmentaciones y despigmentación de la piel, no son más que el producto de la exposición de la población a las radiaciones solares. (Golcalves, 2013.)

Por esta razón, se ha efectuado un sinnúmero de estudios e investigaciones en plantas o extractos de ellas, ya que dichas especies sufren la misma exposición a la radiación o incluso en mayor cantidad que las personas y estas han desarrollado componentes que pueden disuadir, dispersar y/o absorber dicha radiación para su supervivencia.

Dichos componentes de las plantas denominados metabolitos, constituyen el principal punto de investigación para combatir las patologías, siendo los compuestos fenólicos, flavonoides y antioxidantes entre los más importantes. (De Oliveira et al., 2013).

Estudios anteriores han evaluado el poder fotoprotector de una variedad de plantas por varios métodos en base a la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides que presenten en los extractos, con la finalidad de encontrar activos de mayor eficacia para desarrollar nuevas formulaciones farmacéuticas.

Esta investigación tiene el objetivo de evaluar y demostrar que los extractos de *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. poseen una actividad fotoprotectora y antioxidante en muerte inducida por radiación UV a cepas de *Escherichia coli* en base a estudios comparativos comprobados científicamente.

Finalmente, el resultado de ese estudio pretende demostrar científicamente la efectividad fotoprotectora de los extractos de *Passiflora manicata* (Juss.) Pers. para brindar una herramienta a la investigación y desarrollo de nuevos productos farmacéuticos, cosmeceúticos y/o cosméticos, que sirvan de protección contra la radiación UV y de esta manera prevenir afecciones de la piel que acechan actualmente a la población ecuatoriana y del mundo.

1.2. Luz solar.

La luz solar es la manifestación de la energía transmitida como radiación electromagnética irradiada hacia la tierra, muy indispensable para la vida en el planeta. Mediante esta manifestación de la energía se efectúan procesos metabólicos en los seres vivos sea de manera directa o indirecta. (Farmer, 1995.)

De toda la radiación emitida hacia la tierra tan solo el 2-3% llega hacia la superficie de la misma, un porcentaje de radiación se distribuye a lo largo del planeta para mantenerlo cálido y apto para la vida mientras que el restante se utiliza para procesos metabólicos por los seres vivos. (Zubeldia, otros. 2012.)

1.3. Radiación Ultravioleta.

Constituye una porción de la radiación electromagnética emitida por el sol, tiene muchas aplicaciones como la esterilización bacteriana o una alternativa para pasteurización de la leche.

Su rango de longitud de onda comprende desde los (400 – 200nm.) y se lo puede clasificar mediante este rango. (ver Tabla 1-1.) (Copa, 2012.)

Tabla 1-1: La radiación electromagnética según la longitud de onda.

Banda de ondas	Rango de longitud de onda (nm)
De rayos X	0,1-10
Ultravioleta en el Vacío	10-200
Ultravioleta C	200-290
Ultravioleta B	290-320
Ultravioleta A (UV-A)	320-400
UV-A I	340-400
UV-A II	320-340
Visible	400-760
Infrarrojo cercano	760-1000
Infrarrojo lejano	1000-100,000
Microondas y ondas de Radio	> 10 ⁶

Fuente: Goldsmith, 2012.

1.4. Tipos de radiación UV.

- ✓ Radiación UV-C: posee un rango de longitud de onda que va desde los 200-280nm, esta radiación es absorbida por la capa de ozono. Dicha radiación posee propiedades degenerativas, desnaturalizadoras por lo que su principal aplicación es de poder germicida y esterilizador.
- ✓ Radiación UV-B: va desde 280-315nm de longitud de onda, dicha radiación a pesar que su porcentaje de ingreso a la superficie es bajo (5%) es la radiación causante de las principales patologías de la piel al entrar en contacto con esta. Cabe recalcar también, que a pesar de que es una radiación perjudicial para el organismo se lo utiliza en tratamiento de ciertas patologías como la psoriasis y el vitíligo por ejemplo.
- ✓ Radiación UV-A: este tipo de radiación va desde los 315-400nm de longitud de onda, es la radiación que llega en mayor proporción a la superficie de la tierra (95%). Esta radiación que llega hasta el nivel del mar y por ende la que estamos en mayor contacto

por lo tanto, presenta mayor responsabilidad en las afecciones de la piel. (Farmer, 1995.)

1.5. Cantidad de radiación UV recibida.

La cantidad de radiación UV recibida varía en función de factores climatológicos, geográficos, altitud, estacionarios, físicos y tiempo.

El tiempo es un factor importante en la exposición a los rayos solares, estudios afirman que la mayor cantidad de radiación recibida se da en el lapso de 11h00-16h00 horas del día, del mismo modo la cantidad de radiación recibida será mayor en época de verano que en las otras estaciones.

La intensidad de exposición a radiación será mayor en zonas ecuatoriales que en zonas polares, debido a que la radiación es mayor en zonas ecuatoriales, del mismo modo la radiación recibida será mayor en lugares con mayor altitud sobre el nivel del mar es decir, la región sierra recibirá en mayor proporción la radiación solar que la región costa.

La radiación emitida por lámparas focos también afectan a largo plazo al organismo talvez no en mayor proporción como la radiación proveniente del sol pero si otras complicaciones como problemas oculares.

1.6. Fotobiología cutánea.

El organismo posee moléculas bioquímicas denominadas cromóforos que son las encargadas de dar protección frente a las radiaciones provenientes de los rayos solares,

Estos cromóforos se encargan de absorber la radiación UV desencadenando una reacción fotoquímica en el organismo o una reorganización celular. La piel contiene cromóforos como el ADN, los esteroides, liposomas, porfirinas y el ácido urocánico.

Además la piel posee la melanina que actúa como absorbente de radiación y es el principal recurso de protección contra los daños ocasionados por la radiación, debido a que estas absorben al fotón excitado por la radiación y generalmente los liberan en forma de calor.

Los efectos producidos por estas reacciones fotoquímicas que se dan entre los fotones y los cromóforos de la piel, desembocan en efectos que pueden ser agudos, retardados o crónicos según la intensidad de exposición y el daño ocasionado.

Entre las complicaciones crónicas tenemos al fotoenvejecimiento y la fotocarcinogénesis debido a que la dosis de radiación es acumulativa y dependen de la cantidad de radiación recibida así como la fotoprotección del individuo.

1.7. Fototipos cutáneos.

Esta clasificación se basa en cantidad de melanina producida por el organismo. El tipo de piel puede ser de color blanco, marrón o negro y según esta coloración se lo ha clasificado en fototipos de piel. (ver Tabla 2-1.)

Las personas con fototipo de piel SPT I o II son personas de piel blanca pálida con cabello rubio o pelirrojo, generalmente no se broncean y son personas más frecuentes en sufrir quemaduras por radiación solar además, pueden sufrir reacciones alérgicas al exponerse de forma prolongada a dicha radiación.

Las personas que son SPT III o IV son personas que asimilan de una mejor manera el bronceado y generalmente corresponden a este tipo de piel aquellas personas de piel morena intermedia, con cabellos castaños o negros. Padece un ligero enrojecimiento y luego se broncea después de la exposición a la radiación.

Por último, los SPT V o VI son aquellas personas de piel morena o negra denominados melanodermos, este tipo de piel sufre quemaduras si el tiempo de exposición ha sido demasiado prolongado. (Frost, 2005.)

Tabla 2-1: Fototipos cutáneos (SPT).

SPT	Color Básico de la Piel	Respuesta a la exposición
I	Blanca Pálida	No se broncea, eritema solar fácil
II	Blanca	Bronceado difícil, eritema solar fácil
III	Blanca	Bronceado tras eritema solar
IV	Tostada	Bronceado fácil
V	Morena	Bronceado fácil
VI	Negra	Se hace más oscura

Fuente: Zubeldia, 2000.

1.8. Efectos de la radiación solar en la piel.

Como se citó anteriormente dependiendo de la cantidad absorbida de radiación y según el fototipo de piel, el organismo puede presentar efectos agudos como una pigmentación momentánea o efectos agudos como una fotocarcinogenesis.

Dicha radiación, penetra la piel a diferentes niveles siendo la radiación UV-C, luego la UV-B, siguiendo la UV-A, y por último la visible (ver Figura 1-1.), los efectos de estas radiaciones van desde reacciones químicas y fisiológicas en el organismo (como la liberación de calor a causa de la melanina) hasta producir alteraciones patológicas (carcinoma), que sumado al fototipo de piel más sensible (SPT I o II) y la exagerada exposición a los rayos solares, incrementa significativamente las alteraciones cutáneas.

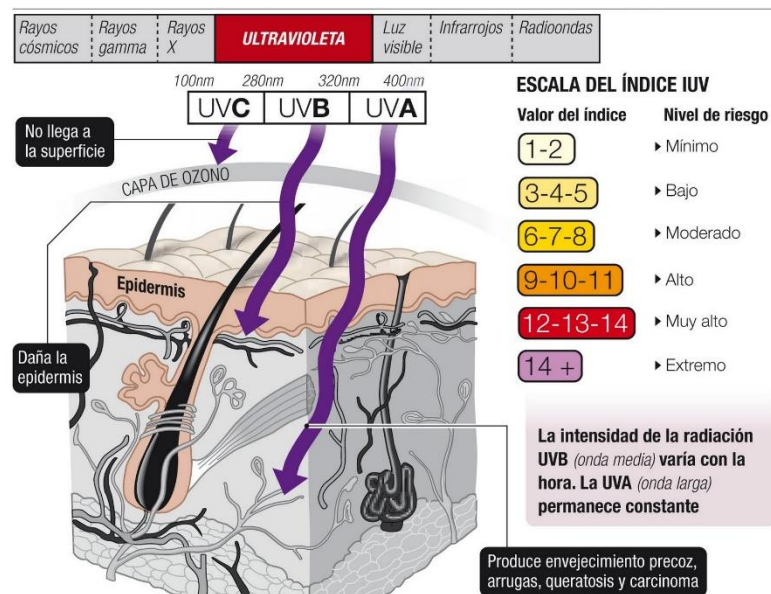


Figura 1-1: Penetración de la radiación UV en la piel.

Fuente: Gramsch, 2011.

1.9. Fotodermatosis.

La fotodermatosis conlleva a un grupo de patologías relacionadas con la piel debido a la exposición de la radiación solar en todas sus manifestaciones (UV, Visible, IR), puede conllevar a dermatologías, fototoxicidad, fotoalergias, etc. (ver Figura 2-1.) (Brogeras, 2010.)

Fotodermatosis idiopáticas
Erupción polimorfa lumínica Prurigo actínico Hidroa vacciniiforme Urticaria solar Dermatitis actínica crónica
Dermatosis agravadas por la luz
Acné Dermatomiositis Eritema multiforme Enfermedad de Darier Enfermedad de Grover Dermatitis seborreica Herpes simple Rosácea Melasma Lupus eritematoso Liquen plano Pénfigo Psoriasis
Medicamentos y sustancias químicas fotosensibilizantes
Amiodarona Tetraciclinas Sulfonamidas Tiacidas Clorpromacina Furosemida Fluoroquinolonas Griseofulvina Retinoides Peróxido de benzoilo Antihistamínicos tópicos Piroxicam Antimaláricos

Figura 2-1: Clasificación de la fotodermatosis.

Fuente: De Argila, 2012.

1.10. Cáncer de piel.

En Ecuador, la incidencia de cáncer de piel ha sufrido un incremento en los últimos años, aproximadamente desde la década de los años 80 se ha elevado un 65% en hombres y un 41% en mujeres tal como se refleja los datos del Registro Nacional de Tumores. (Registro Nacional de Tumores, 2014.)

Además, la estimación de incidencia de radiación ultravioleta (UVI) tolerable según la Organización Mundial de la Salud es de 11 y la ciudad de Quito registra datos de mínimo 16-17

UVI, Riobamba presenta 14-15 UVI, con estos datos se puede afirmar que los problemas relacionados con la piel tienen tendencia a elevarse. (Organización Mundial de la Salud, 2015.)

Por lo tanto, las afecciones de la piel no solo afectan a Ecuador sino al resto del mundo, la sobreexposición a la radiación es la principal causa del desarrollo de estas patologías, cabe recalcar que la radiación se acumula en la piel con el pasar de los años desde la infancia y se manifiestan con mayor intensidad en la vejez.

Desencadenando en problemas serios de la piel, como es el caso del cáncer de piel.

1.11. Tipos de cáncer de piel.

1.11.1. Carcinoma de células basales.

Este tipo de cáncer generalmente se presenta en la epidermis y la causa principal es la sobreexposición a la radiación ultravioleta, se manifiesta en personas pasadas los 40 años pero puede aparecer en jóvenes a causa de una prolongada exposición solar.

El cáncer de células basales es el tipo de cáncer más común en las personas y se manifiesta de forma progresiva, la población con fototipo de piel I o II es la más frecuente en presentar este tipo de patologías, por lo tanto países de población blanca como Australia o EE.UU presentan cifras de 726 casos por cada 100.000 habitantes y 146 casos por cada 100.000 habitantes respectivamente.

Cabe recalcar, que es un tipo de cáncer que podría diseminarse hacia otros tejidos duros en el organismo y puedan reaparecer varias veces, además existen otros factores relacionados en la aparición de este tipo de cáncer como son: la migración de células inflamatorias hacia el sitio afectado producto de la alteración bioquímica de las células de Langerhans, además predisposiciones genéticas como la mutación del gen inmunosupresor P-53 se asocian al cáncer de células basales. (ver Figura 3-1.)

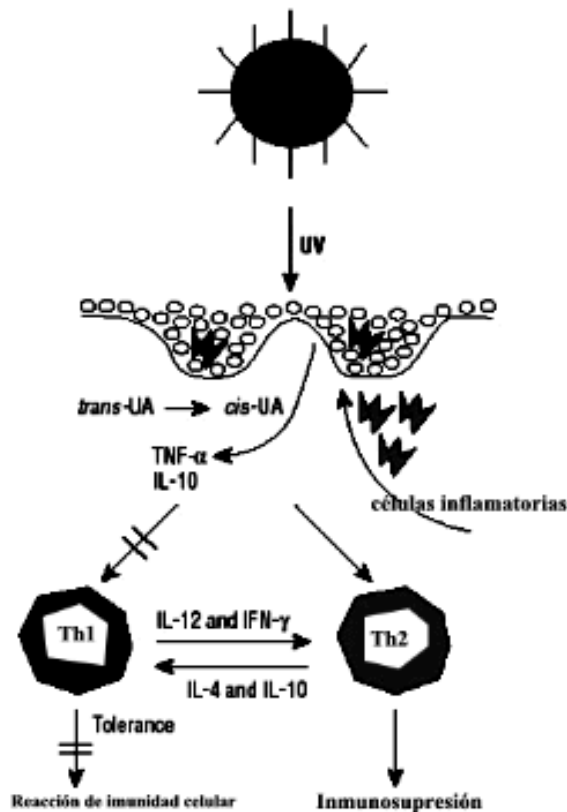


Figura 3-1: Efectos inmunosupresores de la radiación UV en la piel.

Fuente: Gutiérrez, 2003.

1.11.2. Carcinoma de células escamosas.

Este tipo de cáncer se origina a partir del epitelio escamoso como su nombre lo dice, puede afectar no solo la piel sino también mucosas órganos como lengua, mucosas. Es de fácil tratamiento a etapas tempranas pero puede generar metástasis si no se trata a tiempo.

Generalmente, las personas inmunodeprimidas, fotosensibles, el cigarrillo y el tipo de piel recurren en este tipo de afección debido a largas exposiciones de radiación UV y puede formarse en piel normal o en piel con queratinosis actínica. (Sociedad Americana del Cáncer, 2014.)

1.11.3. Melanoma.

Es el tipo de cáncer más perjudicial en las personas que lo padecen, debido a que es un cáncer metastásico y lo vuelve altamente invasivo y se lleva actualmente el 75% de las muertes por cáncer de piel. Como su nombre lo dice es un cáncer debido a un trastorno en los melanocitos de la piel.

Los tumores melánicos son pigmentados y resultan más en personas de piel blanca con fototipos de piel I o II, motivo por el cual, cerca de 160.000 casos se presentan anualmente en el mundo. (Instituto Nacional del Cáncer, 2003.)

1.12. Fotoprotección.

- ✓ Utilizar prendas de vestir que cubran la mayor parte de la piel expuesta por la radiación.
- ✓ En lo posible, utilizar sombrero, gorra y gafas que permitan bloquear la radiación UV en rostro cuello orejas.
- ✓ Evitar la exposición de rayos solares en periodos de tiempo desde las 11h00 hasta las 16h00.
- ✓ Colocarse filtros de protección para radiación UV-A y UV-B de acuerdo al fototipo de piel, relacionando estrictamente a la altitud en la que estamos y de la misma forma la latitud. Preferentemente aquellos que posean antioxidantes y compuestos como las psoralenos, beta-carotenos, etc.
- ✓ No olvidar que el agua, arena y nieve reflejan la radiación solar, por este motivo es necesario e indispensable repetir la aplicación de los filtros solares si nos encontramos en estos lugares, de preferencia cada 3 horas.
- ✓ Evitar el uso de perfumes si se van a exponer a radiación UV de forma alargada.
- ✓ Preguntar a su médico si se están administrando medicamentos fotosensibles o fotoalérgicos para tomar las medidas de precaución necesarias. (Sociedad de Lucha Contra el Cáncer, 2015.)

1.13. Fotoprotección natural de la piel.

Nuestro organismo cuenta con muchas barreras de defensa cuando es atacado y la piel no es una excepción, ya que cuenta con mecanismo propio de fotoprotección y lo realiza de la siguiente manera (Hay que destacar que los niños cuentan con menor protección natural por lo que no se encuentran bien desarrollados y hay que utilizar fotoprotectores artificiales por seguridad):

- ✓ La hiperqueratosis.- que es engrosamiento del estrato corneo de la piel.
- ✓ La melanogénesis.- que es la síntesis y distribución de melanina en toda la piel especialmente en lugares que se encuentran con mayor exposición al sol.
- ✓ Ciertos sistemas enzimáticos, las vitaminas y oligoelementos que actúan para desactivar radicales libres ocasionados por el contacto de la piel con la radiación UV.
- ✓ Un sistema de reparación del ADN, por medio de algunas enzimas (Sociedad Argentina de Dermatología, 2012).

1.14. Filtros solares.

Son sustancias que tienen la finalidad de protección contra la radiación UV y reducir el riesgo de desarrollar alguna patología como fotodermatosis, cáncer de piel, eritemas. Las sustancias deben ser muy seguras que no produzcan reacciones adversas como alergias, y se destaca el ZnO, TiO₂, FeO₂, MgO₂, entre otros; son muy estables y otorgan protección contra la radiación UV pero si la cantidad aplicada a la piel supera el 5% se formará una capa de color blanco que estéticamente no suele ser de agrado.

1.15. Clasificación de los Filtros Solares.

1.15.1. Filtros Físicos.

Son partículas microscópicas que tienen la finalidad de reflejar y difundir la radiación UV-A y B, aunque también lo hacen con la IR y visible; porque produce un efecto pantalla.

1.15.2. Filtros Químicos.

Son sustancias solubles con origen sintético, tienen propiedad cromófora ya que absorbe los fotones a explícitas longitudes de onda. Sirven de gran protección contra la radiación UV aunque algunas personas suelen ser alérgicas a estas moléculas. Entre los más importantes filtros químicos se encuentra el PABA, benzofenonas, cinamatos, entre otros.

1.15.3. Filtros Biológicos.

Son sustancias con propiedad antioxidante como la vitamina A, la vitamina E que para poder aplicarlos se emplean en forma de acetato o palmitato con el fin de aumentar la protección contra los rayos UV y al mismo tiempo que fortalecer al sistema inmunológico de la piel (Esteva, 2005, p.70).

1.16. Factor de protección Solar (SPF).

El factor de protección solar nos permite conocer el número de veces que la sustancia fotoprotectora aumenta la capacidad de defensa natural de la piel antes de que ocurra una quemadura solar y se produzca un eritema. A mayor número de SPF mayor protección contra los rayos UV del sol brindara.

Por ejemplo si se aplica un protector solar SPF 60, en una hora de exposición al sol, apenas se absorberá un minuto de radiación ultravioleta B. Pero esto varía claramente con el SPF que

contenga el protector solar, la cantidad que se utilice y la forma en cómo se utilice (America Society Cancer, 2014) (ver Tabla 4-1, 5 1).

Tabla 3-1: Clasificación del Factor de Protección Solar (SPF) (COLIPA).

Categoría	Factor de Protección Solar (SPF)
Bajo	2-4-6
Medio	8-10-12
Alto	15-20-25
Muy Alto	30-40-50
Ultra	50 o >

Fuente: Sociedad Argentina de Dermatología, 2012.

1.17. Antioxidantes.

Problemas como el alcohol, tabaco, drogas y estrés desembocan en patologías como el envejeciendo celular prematuro y sus relacionados. Dichas patologías son generadas por la cantidad de radicales libres producidos en nuestro organismo producto de las reacciones oxidativas del metabolismo, por tal motivo existen sustancias cuya finalidad es eliminar dichos radicales libres y se les denomina antioxidantes.

En sí, los antioxidantes donan un protón H^+ para efectuar reacción de óxido-reducción y eliminar dichos radicales, la eficacia de estos antioxidantes se relaciona con la velocidad de reacción, la energía producida, y su potencial de óxido-reducción.

De hecho, existen antioxidantes sintéticos Hidroxibutil-tolueno, Hidroxibutil-anisol (BHT, BHA) y naturales como los flavonoides, taninos, cumarinas, antocianidinas, etc. (Brewer, 2011.)

1.18. Antioxidantes naturales.

Proviene de especies vegetales, debido a que estas sintetizan dichos antioxidantes para eliminar los radicales libres que se producen por el estrés oxidativo, tanto como como productos exógenos como la luz y calor o endógenos como el peróxido de hidrogeno.

Dentro del grupo de antioxidantes se considera a aquellas plantas que poseen compuestos fenólicos, incluso hasta de mayor eficacia que el BHA como es el caso del rosmanol o el carnosol. Seguido tenemos a los diterpenos fenólicos como el ácido carnosólico, finalmente tenemos a los flavonoides (quercetina y catequina) entre los más representativos.

Los aceites esenciales también son considerados como antioxidantes y entre los más representativos tenemos al eugenol, mentol, timol, etc. Todos estos compuestos actúan como antioxidantes naturales y pueden eliminar radicales libres del organismo. (ver Figura 4-1.) (Brewer, 2011.)

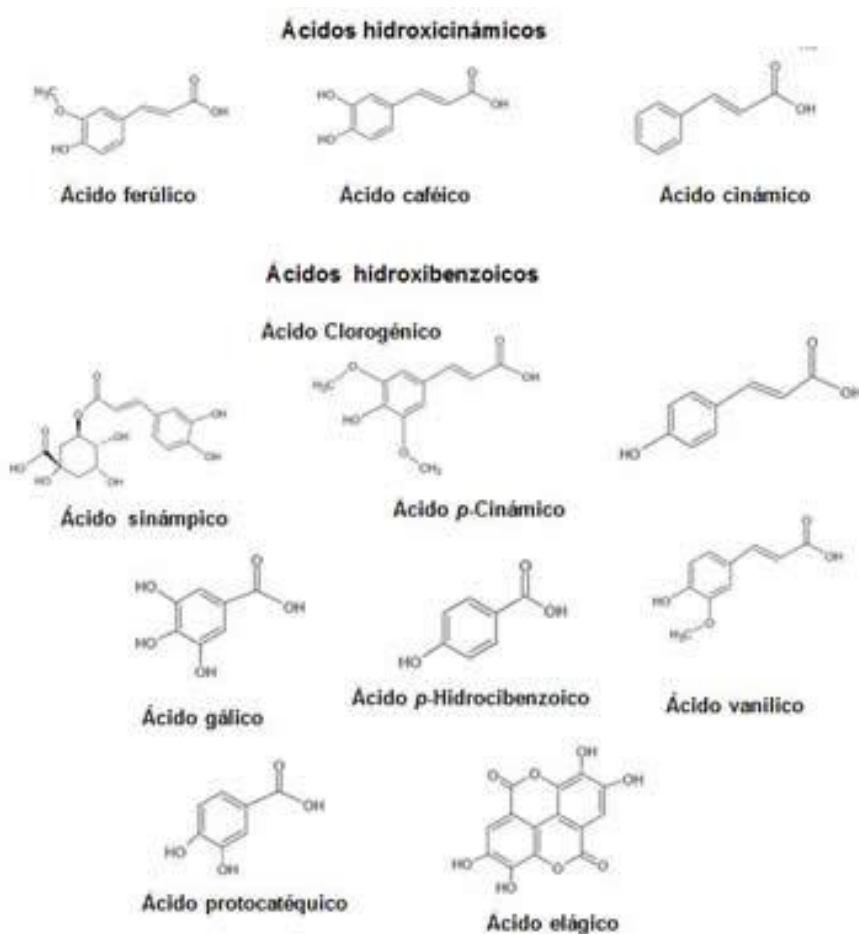


Figura 4-1: Ácidos antioxidantes fenólicos.

Fuente: Brewer, 2011.

1.19. Flavonoides en plantas y su función.

Consideradas como el pigmento de las plantas, los flavonoides son sustancias que se originan a partir de la fenilalanina y la malonil-CoA, su función principal en las plantas es para protección frente a los herbívoros por brindar un sabor desagradable a las plantas que lo poseen también frente a los radicales libres producto del metabolismo de nutrientes.

Normalmente los flavonoides se sitúan en la parte superficial de las plantas y en una mayor proporción en sus inflorescencias, para su estudio se lo han clasificado en 6 tipos: flavonas, flavonoles, flavandioles, chalconas, antocianinas y taninos. (ver Figura 5-1.) (Martinez, 2013.)

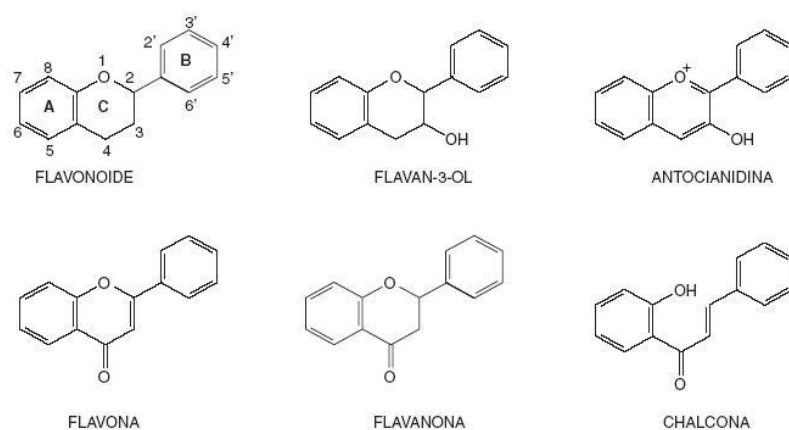


Figura 5-1: Antioxidantes flavonoides.

Fuente: Brewer, 2011.

1.20. Flor de la pasión (*Passiflora manicata* (Juss.) Pers.).



Figura 6-1: *Passiflora manicata* (Juss.) Pers.

Fuente: Stalin Santamaría, 2015.

Clasificación científica.

Reino: Plantae

Orden: Malpighiales

Familia: Passifloraceae

Género: Passiflora

Especie: *Passiflora manicata* (Juss.) Pers.

(Free and Open Access to Biodiversity Data, 2013.)

1.21. Descripción botánica.

Arbusto escalador que alcanza hasta 7 metros, flores y frutos contienen laminas foliares. Posee hojas trilobuladas y angulares de 4.2-10.0 cm de largo y 5.0 -12 cm de ancho. El tallo angular pubescentes o glabros, flores erectas aproximadamente de 5.0-5.6 cm de largo, pétalos subsimilares a los sépalos, el opérculo esta aproximado a 1 cm de la base del hipantio.

Los frutos tienen forma obovada con pericarpio coriáceo, de color verde y semillas acorazonadas de 3.5cm a 5.1 de largo y 2.0 a 3.0 de ancho color café oscuro. La flor es erecta que posee una coloración roja intensa, autogama y poliformica casi con las características similares al subgénero Tacsonia. (Escobar, 1988.)

1.22. Origen y distribución.

Planta nativa de Ecuador, Colombia, Venezuela y Perú. Se origina en los andes ecuatorianos a una altura de 1.400-2.800 metros, y crece de una manera silvestre en forma de enredadera. (Escobar, 1988.)

1.23. Propiedades terapéuticas.

Generalmente las Pasifloras con usadas como sedantes ya que ejercen una acción depresora del sistema nervioso, pudiendo también ser utilizadas como ansiolíticos o contra el insomnio por elevar el ácido gamma-aminobutírico (GABA). Algunos estudios de en Pasifloras comparan su acción sedante casi similar a la benzodiacepina. (African Flowering Plants Database, 2008.)

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de la Investigación.

Laboratorio de Productos Naturales, Laboratorio de Química Analítica e Instrumental y Laboratorio Clínico y Bacteriológico de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. Recolección del Material Vegetal.

Se procedió a recolectar en los alrededores del popular sector conocido como El Tablón, cantón Pallatanga, Chimborazo-Ecuador. Puntos GPS (X= 766932; Y= 9750250; Z= 3780 m.s.n.m.).

2.3. Identificación Botánica y Taxonómica.

Se tomaron cinco muestras de plantas que fueron prensadas y entregadas en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo para brindar información sobre la descripción taxonómica.

2.4. Determinación del Contenido de Humedad.

Es un método gravimétrico se realiza por desecación y para determinar se parte de 2 gramos de material vegetal triturado, se transfiere a una cápsula previamente tarada, posteriormente se procede a secar en la estufa por 3 horas a 105 °C. Una vez cumplido el tiempo se coloca la cápsula en un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa; nuevamente se coloca la cápsula en la estufa por una hora y se repite el procedimiento hasta que el peso sea constante. Esta determinación se realizó por triplicado y posteriormente se realizó los cálculos (Aragadvay, 2009, p.65).

Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{M2 - M3}{M2 - M1} \times 100$$

En el que:

M1: Representa la masa de la cápsula vacía.

M2: Representa la masa de la cápsula con la muestra antes del proceso de secado.

M3: Representa la masa de la cápsula con la muestra desecada.

100: Es un factor matemático para los cálculos.

2.5. Determinación de Cenizas Totales.

Es un método gravimétrico y para esta determinación se procede a pesar 2 gramos de material vegetal triturado, se transfiere a un crisol de porcelana anteriormente tarado, se coloca en un reverbero para carbonizar la muestra y posteriormente se introduce en un horno mufla a 700 °C por 2 horas. Una vez cumplido el tiempo se coloca el crisol de porcelana en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa; se coloca nuevamente en el horno mufla a 700 °C por media hora y se repite el procedimiento hasta que el peso sea constante. En caso de que se presente trazas de carbón en el residuo se le añade gotas de peróxido de hidrógeno, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio 10 mg en 100 mL y se procede a evaporar con la finalidad de que el residuo sea casi o de color blanco.

Esta determinación se realizó por triplicado y posteriormente se realizó los cálculos (Aragadvay, 2009, p. 66).

Cálculos:

$$\%C1 = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

$$\%Ct = \frac{C1}{100 - H} \times 100$$

En el que:

%C1: Representa al porcentaje de cenizas en base hidratada.

M: Representa a la masa del crisol de porcelana vacío.

M1: Representa a la masa del crisol de porcelana con la muestra antes del proceso de incineración.

M2: Representa a la masa del crisol de porcelana con la muestra incinerada.

%Ct: Representa al porcentaje de cenizas totales en base anhidra.

H: Representa al porcentaje de humedad.

100: Es un factor matemático para los cálculos.

2.6. Determinación de Cenizas Solubles en Agua.

Es un método gravimétrico en el que para la determinación a las cenizas totales se le añade 20 mL de agua destilada, se procede a tapar el crisol de porcelana y se hace hervir de manera suave por 5 minutos en un reverbero. En un papel filtro totalmente limpio se filtra la solución resultante y se lo coloca al crisol de porcelana inicial, posteriormente se carboniza en un reverbero y se incinera en un horno mufla a 700 °C por 2 horas. Una vez cumplido el tiempo se colocó en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa; el proceso se repite en intervalos de media hora hasta alcanzar un peso constante. Esta determinación se realizó por triplicado y luego se realizaron los cálculos (Aragadvay, 2009, p. 67).

Cálculos:

$$\%C1 = \frac{M2 - M4}{M1 - M} \times 100$$

$$Ca = \frac{C1}{100 - H} \times 100$$

En el que:

%C1: Representa al porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M: Representa a la masa del crisol de porcelana vacío.

M1: Representa a la masa del crisol de porcelana con la muestra antes del proceso de incineración.

M2: Representa a la masa del crisol de porcelana con la muestra incinerada.

M4: Representa la masa del crisol de porcelana con las cenizas insolubles en agua.

Ca: Representa las cenizas totales solubles en agua en base anhidra.

H: Representa el porcentaje de humedad.

100: Es un factor matemático para los cálculos.

2.7. Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico.

Es un método gravimétrico en el que para la determinación a las cenizas totales se le añade 20 mL de ácido clorhídrico al 10%, se procede a tapar el crisol de porcelana y se hace hervir de manera suave por 5 minutos en un reverbero. En un papel filtro totalmente limpio se filtra la solución resultante y se lava con agua destilada caliente hasta que al acidularle con ácido nítrico; al cual se procede añadir 2 gotas de nitrato de plata 0,1 M no presente muestras de cloruros y se lo coloca al crisol de porcelana inicial, posteriormente se carboniza en un reverbero y se incinera en un horno mufla a 700 °C por 2 horas. Una vez cumplido el tiempo se colocó en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa; el proceso se repite en intervalos de media hora hasta alcanzar un peso constante. Esta determinación se realizó por triplicado y luego se realizaron los cálculos (Aragadvay, 2009, p. 68).

Cálculos:

$$\%C1 = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

$$\%Ci = \frac{C1}{100 - H} \times 100$$

En el que:

%C1: Representa el porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M: Representa a la masa del crisol de porcelana vacío.

M1: Representa a la masa del crisol de porcelana con la muestra antes del proceso de incineración.

M2: Representa a la masa del crisol de porcelana con la muestra incinerada.

%Ci: Representa las cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base anhidra.

H: Representa el porcentaje de humedad.

100: Es un factor matemático para los cálculos.

2.8. Screening Fitoquímico.

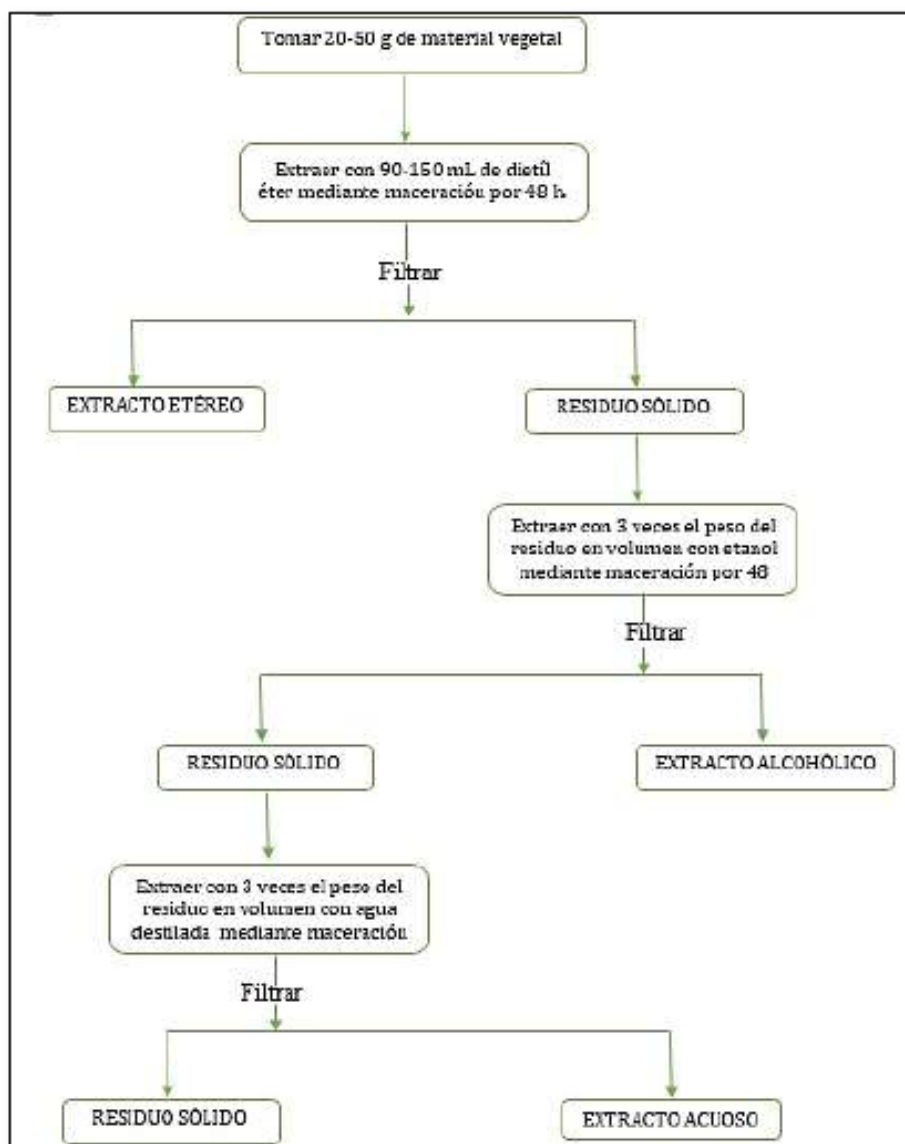


Figura 1-2: Técnica para el screening Fitoquímico.

Fuente: Miranda M., 2001.

2.9. Análisis Fisicoquímicos Cualitativos

2.9.1. Reacciones de Caracterización.

Para la realización de los ensayos se procedió de la siguiente manera:

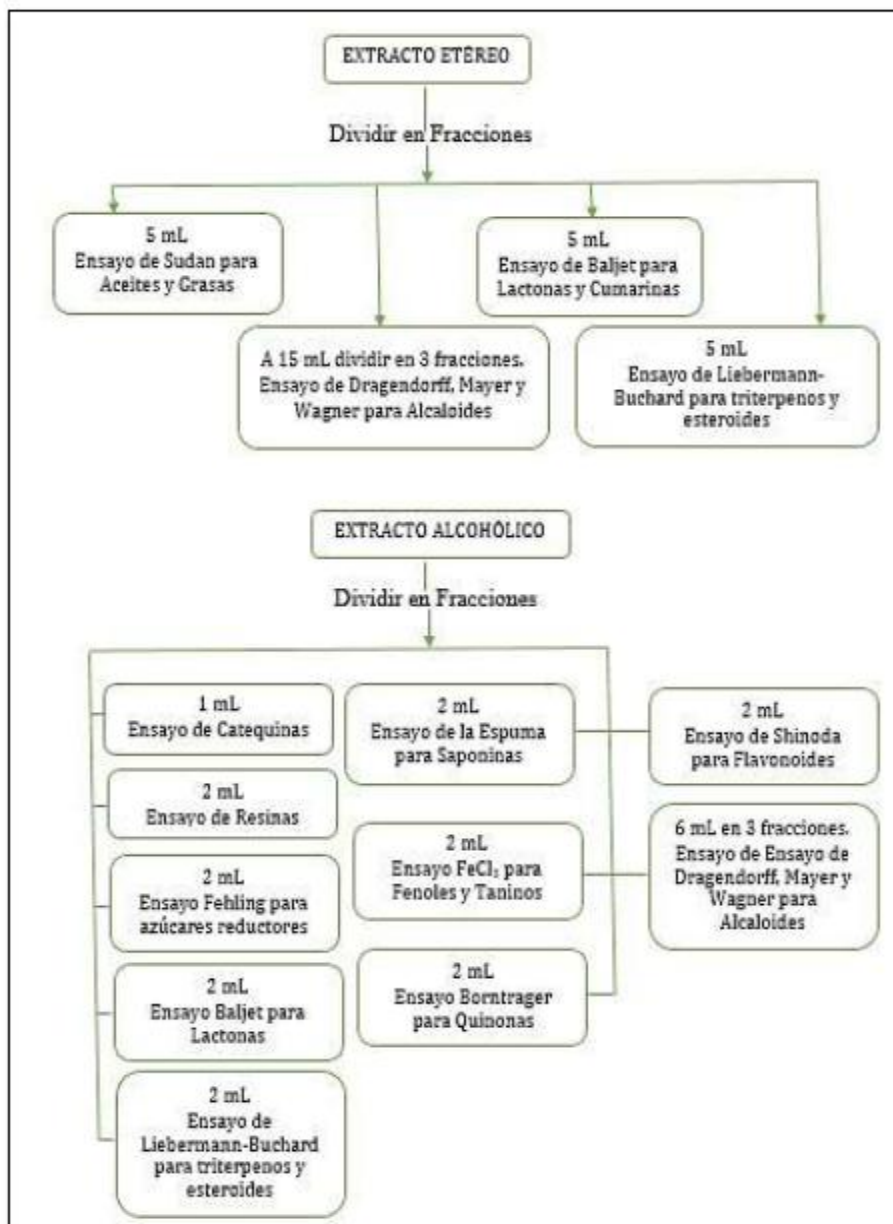


Figura 2-2: Técnica para el screening Fitoquímico extracto etéreo.

Fuente: Miranda M., 2001.

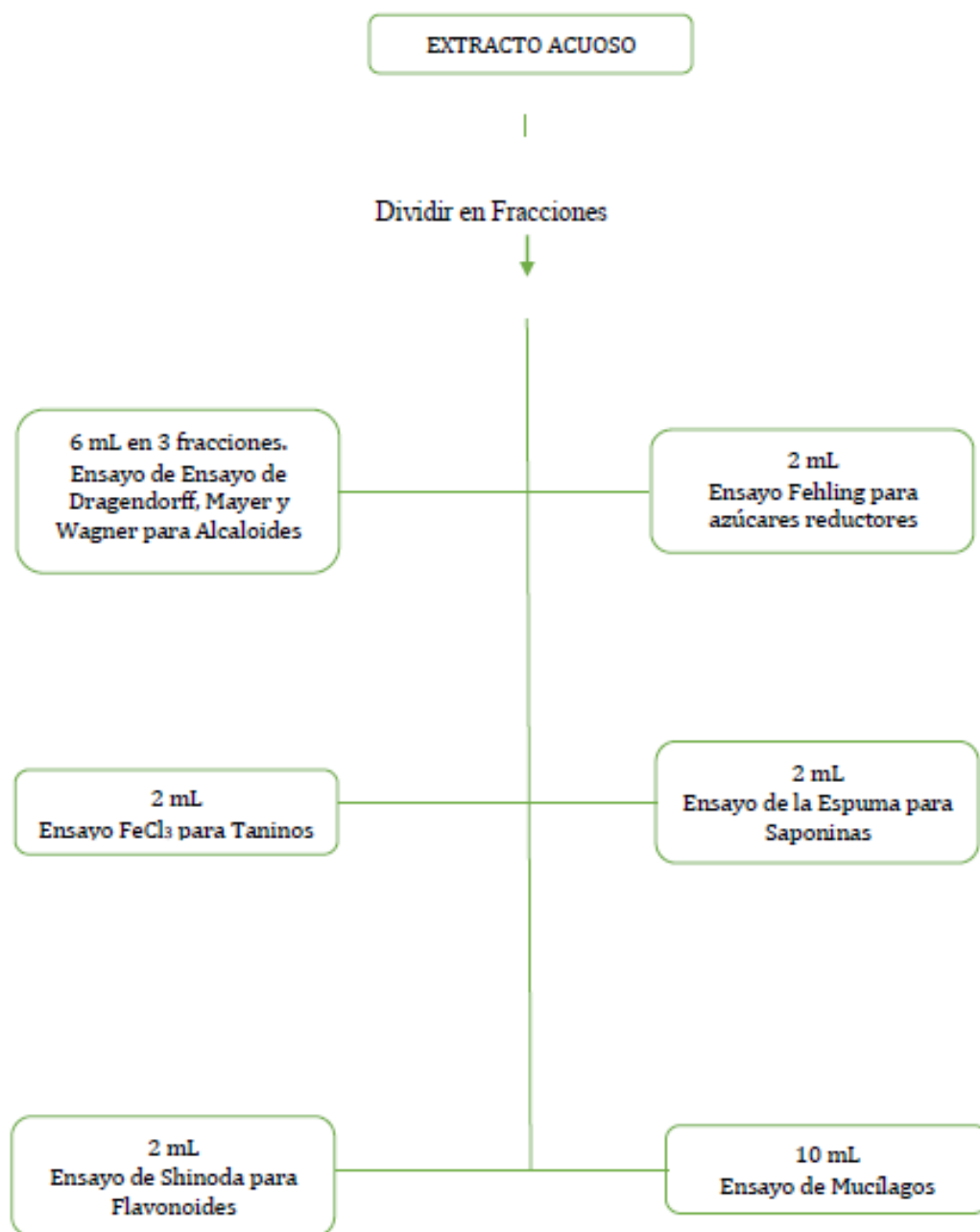


Figura 3-2: Técnica para el screening Fitoquímico extracto acuoso.

Fuente: Miranda M., 2001.

2.10. Obtención del Extracto EtOH y Subextractos de *Passiflora manicata* (Juss.) Pers.

Para obtención de los respectivos extractos de investigación, una vez recolectados los especímenes vegetales se procedieron a secarlos a temperatura ambiente protegido del sol para luego reducir el tamaño de partícula en un molino, se utilizó todas las partes del vegetal. A partir de 50 g de planta seca y molida se procedió a macerar previo su humectación en etanol al 70% protegido de la luz a temperatura ambiente por 72 horas y se filtró las clorofilas. Al

extracto etanólico resultante se concentró a través de un rotavapor a 45 °C posteriormente se extrajo sucesivamente con Hexano, Cloroformo, Acetato de etilo y Etanol en orden creciente de polaridad. A todas las fracciones de extracto se procedió a concentrar en rotavapor a 40 °C hasta sequedad las mismas que se utilizaron en la presente investigación.

2.11. Determinación del contenido de Fenoles Totales.

- a) Una alícuota (40 µL) de un diluido de subextractos de Hexano, Cloroformo, Acetato de etilo y Etanol, agregar 3,16 mL de agua destilada y 200 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y mezclar bien.
- b) Agitar la mezcla y dejar reposar durante 6 min, antes de añadir 600 uL de solución de carbonato de sodio, y agitar para mezclar.
- c) Reposar las soluciones a 20 ° C durante 2 horas y la absorbancia de cada solución se determinó a 765 nm frente a la absorbancia del blanco y la trama de la absorbancia vs. concentración.
- d) Contenidos fenólicos totales de los extractos se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo (mgGAE / g) a través de la curva de calibración con ácido gálico. El rango de la curva de calibración va de 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm y 150 ppm ($R^2 = 0,9957$).
- e) Todas las muestras se realizaron por triplicado (De Oliveira et al., 2013, pp. 122 127).

2.12. Determinación del contenido de Flavonoides Totales.

- a) Una alícuota (0,5 mL) de un diluido de subextractos de Hexano, Cloroformo, Acetato de etilo y Etanol, se mezcla con 2 mL de agua destilada.
- b) Añadir 0,15 mL de Nitrito de Sodio al 5 %.
- c) Seguidamente añadir 0,15 mL de Cloruro de Aluminio al 10 %, mezclar y dejar reposar por 6 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
- d) Una vez cumplido el tiempo se añade 2 mL de Hidróxido de sodio al 4 %, mezclar y dejar reposar por 15 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
- e) La absorbancia de cada solución se determinó a 510 nm frente a la absorbancia del blanco y la trama de absorbancia vs. Concentración.

f) El contenido de flavonoides totales de los extractos se expresaron como mg de equivalentes de quercetina por gramo (mgQE / g) a través de la curva de calibración de quercetina. El rango de la curva de calibración va de 1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm y 10 ppm preparada en metanol (R2= 0,9991). Se realizó por triplicado (Wu y Lean-Teik, 2008, pp. 323–330).

2.13. Determinación de Factor de Protección Solar (SPF) in vitro.

Para la determinación del SPF los extractos secos se diluyen en etanol 96%, luego se prepara una solución a 20 ppm. Posteriormente se realizó la exploración espectrofotométrica a longitudes de onda entre 290 a 320 nm, con intervalos de 5 nm a través de un espectrofotómetro UV cuyas dimensiones de la cubeta de cuarzo es de 1 cm y se utiliza el etanol 96% como blanco para esta determinación (Violante et al., 2009, pp. 252-253). El cálculo del SPF de los diferentes extractos se obtuvo mediante la ecuación perfeccionada por Mansur en 1986:

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

En el que:

EE (λ): representa el espectro de efecto eritemal.

I (λ): representa la intensidad del espectro solar.

Abs(λ): representa la absorbancia del producto con protección solar.

CF: es el factor de corrección igual a 10.

La relación entre el efecto eritemogénico y la intensidad de la radiación de cada longitud de onda (EE(λ) x I(λ)) es una constante determinada por Sayre et al. (ver Figura 4-2.) y se muestra a continuación.

Longitud de onda (nm)	290	295	300	305	310	315	320	TOTAL
EE (λ) x I (λ)	0,0150	0,0817	0,2874	0,3278	0,1864	0,0839	0,0180	1,000

Figura 4-2: Los valores de EE X I

Fuente: Sayre, 1979.

2.14. Efecto protector contra la radiación UV-B de la muerte celular inducida.

Una cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) se cultivó en un caldo de infusión de cerebro/corazón, se procedió a cultivar en agar Mueller Hinton. Las bacterias se suspendieron en suero fisiológico 0,85% hasta alcanzar una concentración de 0,5 Escala Mcfarland (1.5×10^8 UFC/ml), y se transfirieron a tubos de cuarzo (espesor 1 mm, capacidad de 4 ml).

Cada extracto seco se disolvió en el disolvente apropiado a concentraciones (2000 ppm, 200 ppm y 20 ppm) y se transfirió en un tubo de cuarzo.

El tubo que contiene las bacterias se colocó detrás del tubo que contiene la sustancia fotoprotectora, formando una unidad experimental. Las unidades experimentales fueron irradiadas con una lámpara de UV-B y sembradas en agar Mueller Hinton (Philips, Broadband TL 40w/12 RS). Dosis de irradiación fue de 0,60 J / cm². Se detectó el número UFC (Unidades Formadoras de Colonias) sobrevivientes de acuerdo con el método de dilución en diferentes períodos de tiempo (0-240 min) en intervalos de 30 minutos.

Las sustancias empleadas fueron subextracto hexánico, clorofórmico, acetato de etilo y etanólico (Acevedo et al., 2005, pp. 301-309). Se utilizó dos controles positivos OMC (octil-metoxicinamato) y Pamidato-O.

Los controles negativos fueron los solventes utilizados para disolver las sustancias fotoprotectoras.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados.

3.1.1. *Determinación del Contenido de Humedad.*

Previo la utilización de la droga cruda es necesario realizar un control de calidad de la misma para determinar las óptimas condiciones para la presente investigación. En esta determinación se utilizó el método gravimétrico de secado en estufa de aire en el que se obtuvo un valor de $12,45\% \pm 0,04$ de contenido de humedad de la flor de la pasión (*Passiflora manicata*) encontrándose dentro de los valores de referencia dados por la Farmacopea Española 2002 que el límite es del 14% (Cazorla, 2013, pp. 1-36) (ver Tabla 1-3.). El análisis del contenido de humedad viene a ser de gran importancia porque de tener un valor elevado la droga cruda debe ser rechazado por la mala estabilidad que puede presentar debido a proliferación de bacterias y hongos que pueden ocasionar pérdida de los metabolitos por la degradación e hidrólisis de los mismos, esto puede incurrir en una mala estabilidad en el producto final (Enríquez et al., 2008, p. 57).

3.1.2. *Determinación de Cenizas Totales.*

Los resultados obtenidos en el análisis de cenizas totales fueron de $1,74\% \pm 0,14$ en base hidratada y $1,95\% \pm 0,16$ en base anhidra (ver Tabla 2-3.), los cuales se encuentran por debajo de los límites establecidos por la Farmacopea Española 2002 que es máximo 5% (Guerrero, 2014, p. 33) y en comparación con estudios similares, naturalmente el valor en base anhidra es mayor por el poco contenido de humedad de la muestra. La determinación de este parámetro es de gran importancia debido a que representa la calidad del material vegetal en el que valores elevados suponen un procedimiento de recolección y almacenamiento inadecuados, gran cantidad de minerales, metales pesados y residuos inorgánicos como carbonatos, fosfatos, sulfatos, silicatos y sílice, que puede surgir por contaminación o por la localización geográfica y características de la planta.

3.1.3. *Determinación de Cenizas Solubles en Agua.*

En la presente determinación se obtuvo los resultados siguientes: $0,89\% \pm 0,18$ para base hidratada y $0,99\% \pm 0,2$ (ver Tabla 3-3.), lo que demuestra que se encuentra dentro de los límites

establecidos por la Farmacopea Española 2% (Cazorla, 2013, pp. 1-36). Los resultados muestran un bajo contenido de cenizas solubles en agua lo que se interpreta en una menor cantidad de minerales y metales pesados o metales alcalinos en la droga cruda así como la no presencia excesiva de contaminación con restos inorgánicos que provienen del área de recolección, verificando así su óptima calidad para el presente estudio investigativo (Gualli et al., 2012, pp. 1-60).

3.1.4. Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico.

Los resultados para este análisis fueron de $0,15\% \pm 0,02$ para base hidratada y $0,21\% \pm 0,02$ en base anhidra (ver Tabla 4-3.), los mismos que se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la Farmacopea Española 2002 con un máximo de 1% (Cruz, 2009, pp. 98-99). Este parámetro indica que la muestra contiene muy poca cantidad de contaminación por sílice, principalmente la tierra silíceas y arena que se encuentran presentes en el entorno de la *Passiflora manicata*, además de la poca cantidad de contaminación con productos térreos haciéndola apta para el presente estudio (Sharapin, 2008, pp. 146-150).

3.1.5. Screening Fitoquímico.

El screening fitoquímico consiste en la identificación de la presencia o ausencia de los grupos funcionales o metabolitos secundarios apreciados colorimétricamente o por precipitación, es un método cualitativo. Método de gran importancia que radica en extraer los metabolitos secundarios por medio de extracciones con solventes de polaridad creciente como son: éter dietílico, etanol 70% y agua, éstos hacen que suceda un cambio de pH del medio y extraen los metabolitos de acuerdo a la solubilidad que presentan (Miranda y Cuéllar, 2001, pp. 141, 207, 291-292). A través del éter dietílico se extraen los componentes lipófilos en el caso de la *Passiflora manicata* se destaca la moderada presencia de triterpenos, esteroides, aceites y grasas (ver Tabla 5-3.). Seguido con el etanol al 70% se extraen metabolitos secundarios afines a su polaridad (Villar, 1999, pp. 136-267), generalmente compuestos hidrófilos que en la *Passiflora manicata* fue una posible presencia de triterpenos y esteroides, alta presencia de lactonas, cumarinas, azúcares reductores, fenoles, taninos, antocianidinas y flavonoides (ver Tabla 5-3.). Al final el agua extrae los metabolitos con mayor polaridad y cabe resaltar que “es capaz de extraerlos en su forma ionizada” (Enríquez et al., 2008, p. 57).

Los metabolitos que fueron identificados con posible presencia son flavonoides y saponinas, alta evidencia de azúcares reductores, fenoles y taninos (ver Tabla 5-3.). De esta manera se comprueba cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios que brindaron protección contra la radiación UV-B en el presente estudio. Finalmente se reporta la no presencia de

alcaloides, resinas, mucílagos, catequinas que podría ser por la poca o nula cantidad de estos metabolitos en el vegetal y debido a que el método cualitativo no es lo suficientemente potente para identificarlos.

3.1.6. Rendimiento y cantidad de los Subextractos de *Passiflora manicata* (Juss.) Pers.

Mediante este parámetro determinamos la cantidad real expresada en porcentaje de extractos secos obtenidos por medio de extracciones con diferentes solventes; dando como resultado un rendimiento de 0.36% el subextracto hexánico con 0,182g; 0,66% el subextracto clorofórmico con 0,330g; 0,40% para el subextracto con acetato de etilo con 0,200g y 0,39% para el subextracto con etanol (ver Tabla 6-3.). Estos subextractos secos fueron utilizados para realizar los diferentes análisis.

3.1.7. Análisis Cualitativo de los Grupos Fitoquímicos por TLC (Cromatografía en Capa Fina)

El presente análisis se realizó con la finalidad de determinar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el Extracto y Subextracto de *Passiflora manicata* y para lo cual se utilizó sílica gel 60F254 como absorbente y como sistema de solvente el Acetato de etilo: Ácido acético glacial: Ácido Fórmico: Agua, en proporciones (100 : 11 : 11 : 26 v/v) y revelado UV-254nm (Fluorescencia de los flavonoides) (Wagner y Bladt, 1996, pp. 146, 147, 190, 191). Estos metabolitos pueden ser responsables directos de la actividad fotoprotectora por sus propiedades antioxidantes (ver Tabla 7-3, 8-3).

Tabla 7-3: Extractos con su correspondiente Rf y metabolito identificado.

Rf= X/Y Manchas	Subextracto Etanólico	Subextracto Clorofórmico	Subextracto Acetato de Etilo
1	0,44	0,45	0,45
2	0,65	0,65	0,66
3	0,70	0,70	0,70
X = distancia recorrida por el compuesto			
Y= distancia recorrida por el eluyente			

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.1.8. Determinación del contenido de Fenoles Totales.

En la presente determinación se realiza una curva de calibración de ácido gálico que va de 50 a 150 ppm (ver Figura 1-3.), y se procede a verificar el contenido de fenoles totales expresados en mgEAG/g empleando la ecuación de la recta $A = 0,0015C - 0,0106$ (A = Absorbancia, C = concentración), despejando la fórmula se obtiene la cantidad de fenoles totales en ppm para una posterior multiplicación por el factor de dilución (Ochoa et al., 2013, p. 57). El ensayo se lo realiza mediante método de Folin-Ciocalteu útil para conocer la eficacia de la extracción de compuestos fenólicos en los diferentes solventes (Singleton et al., 1999, pp. 152-178) determinándose los valores promedio de $7,53 \pm 0,13$ mgEAG/g para el subextracto hexánico; $8,45 \pm 0,08$ mgEAG/g para el subextracto clorofórmico; $12,78 \pm 0,15$ mgEAG/g para el subextracto de acetato de etilo y $14,21 \pm 0,19$ mgEAG/g para el subextracto etanólico (ver Figura 2-3.) (ver Tabla 9-3). La cantidad de fenoles totales obtenidos de la *Passiflora manicata* representan una importante cantidad (De Oliveira, et al., 2013, p. 102), cabe recalcar que la actividad antioxidante y fotoprotectora no siempre se correlaciona con la presencia de grandes cantidades de compuestos polifenólicos, esto se determina mediante los resultados obtenidos al evaluar las actividades farmacológicas como antioxidantes, fotoprotección, etc., (Ordoñez et al., 2006, p. 454). Los tejidos vegetales de la *Passiflora manicata* contienen una amplia variedad de compuestos con actividad antioxidante como los compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados, carotenoides y terpenos, entre otros, además que en su localización geográfica se encuentra en contacto directo con la radiación solar haciendo que el vegetal desarrolle metabolitos para protegerse de la misma poseyendo actividad fotoprotectora (Wu y Lean-Teik, 2008, p. 323–330), siendo estos metabolitos secundarios los responsables directos en la absorción de radiación UV-B por su acción inhibidora de quimioluminiscencia otorgando fotoprotección en los ensayos determinados (Krol et al., 1996, pp. 19-25).

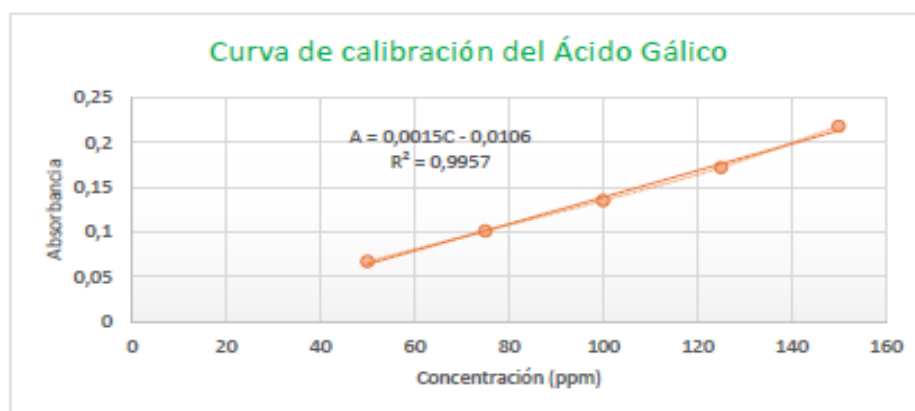


Figura 1-3: Curva de calibración del Ácido Gálico.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

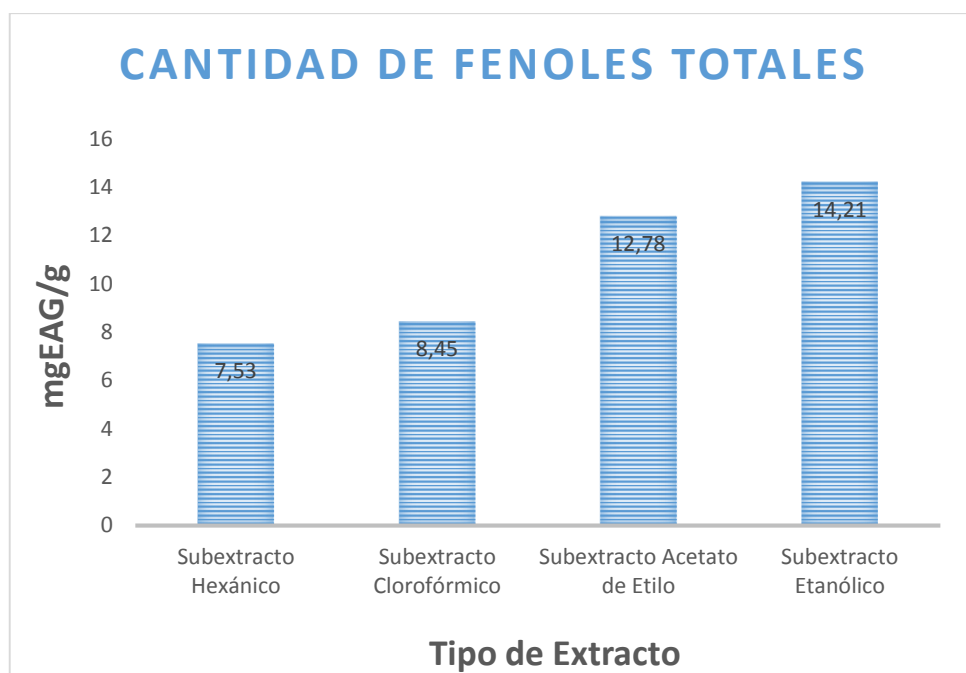


Figura 2-3: Comparativa de la Cantidad de Fenoles Totales entre subextractos.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.1.9. Determinación del contenido de Flavonoides Totales.

Para determinación de este ensayo se realizó una curva de calibración de quercetina con valores que van de 1 a 10 ppm (ver Figura 3-3.), de forma similar a los fenoles totales se cuantifica los flavonoides mediante la ecuación de la recta $A = 0,0896C + 0,1833$ (A = Absorbancia, C = concentración) reemplazando el valor de la absorbancia y despejando la concentración dándonos como resultado la concentración en ppm para multiplicarlo por el factor de dilución rindiendo los valores de flavonoides totales expresados como mgEQ/g de extracto; los resultados $5,24 \pm 0,09$ mgEQ/g para el subextracto hexánico; $6,03 \pm 0,11$ mgEQ/g para el subextracto clorofórmico; $9,67 \pm 0,17$ mgEQ/g para el subextracto acetato de etilo y $11,96 \pm 0,07$ mgEQ/g para el subextracto etanólico (ver Tabla 10-3.) (ver Figura 4-3.).

Los flavonoides y compuestos fenólicos son los principales metabolitos de las plantas que especialmente se encuentran en las capas externas confiriéndole la capacidad antioxidante (Mei, et al., 2015, p. 307). En base a los resultados obtenidos de flavonoides totales se considera que la *Passiflora manicata* posee una relativa cantidad de metabolitos pero que son potentes antioxidantes demostrándose en su actividad fotoprotectora.

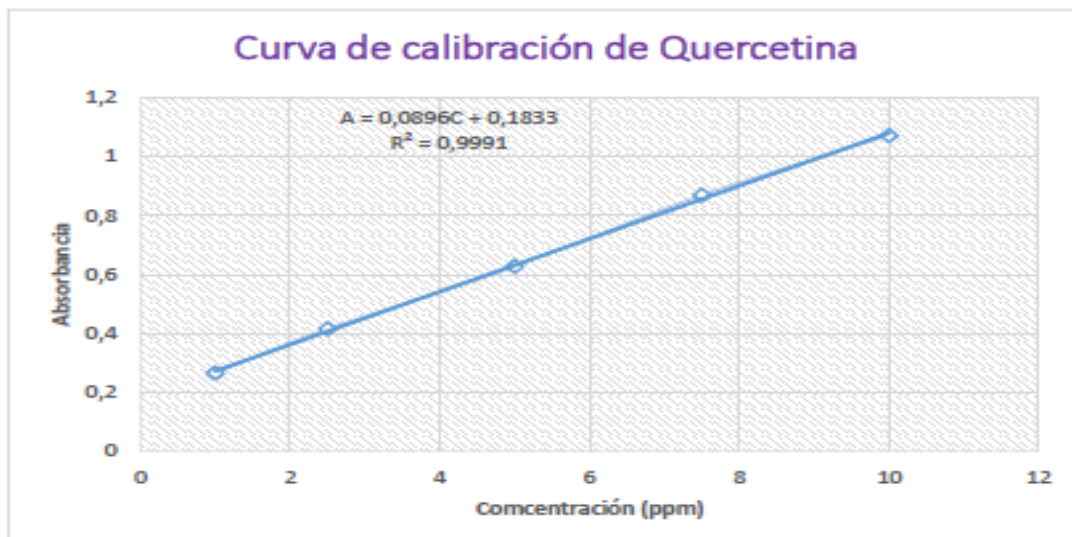


Figura 3-3: Curva de calibración de Quercetina.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

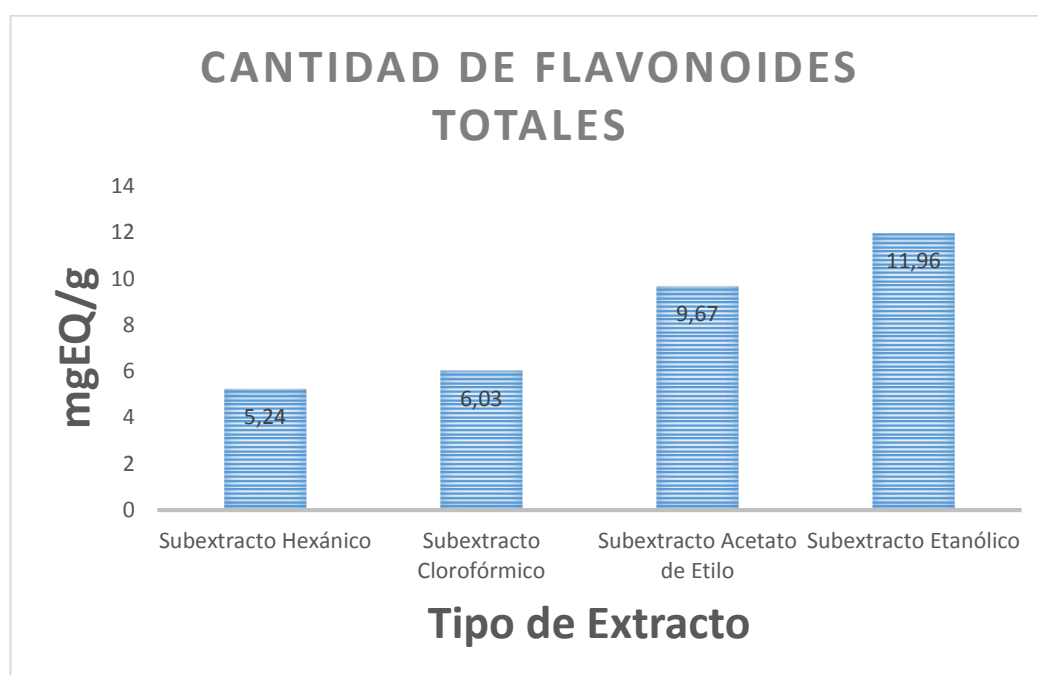


Figura 4-3: Comparativa de la Cantidad de Flavonoides Totales entre subextractos.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.1.10. Determinación del Factor de Protección Solar (SPF) *in vitro*.

Los resultados obtenidos del SPF (Factor de Protección solar) mediante la ecuación de Mansur (De Oliveira, et al., 2013, p. 102) a concentraciones de 20ppm por cada subextracto son $5,47 \pm 0,0085$ para el subextracto hexánico, $14,24 \pm 0,0041$ para el subextracto clorofórmico, $20,07 \pm$

0,0085 para el subextracto con acetato de etilo y $23,76 \pm 0,0065$ con el mayor valor para el subextracto etanólico (ver Figura 5-3) (ver Tablas 11-3 a 14-3.).

Mediante la prueba de Shapiro-Wilk verificamos que se cumple el supuesto de Normalidad con un p-value $> 0,05$ indicando que los datos se encuentran normalmente distribuidos, seguido de un test Levene para determinar la Homogeneidad de varianzas dando un p-value $> 0,05$ lo que indica la Heterogeneidad de las varianzas, y mediante el ANOVA Unifactorial con un valor p-value $< 0,05$ se observa que existen diferencias significativas de la fotoprotección contra la radiación UV-B en base a los resultados de SPF de cada subextracto, presentando mayor fotoprotección el subextracto etanólico (ver Figura 6-3) y corroborado por la prueba Post-hoc de HSD Tukey con p-value $< 0,05$ al 95% de confianza estadística (ver Anexo F). Para los análisis estadísticos se utilizó el Software IBM SPSS Statistics Versión 23.0.0.0 (2015).

En vista de los resultados se puede estimar que la *Passiflora manicata* presenta una excelente actividad contra la radiación UV-B, además se la puede comparar con estudios similares realizados donde con menor cantidad de Fenoles y Flavonoides Totales supera las expectativas con un gran umbral de actividad biológica partiendo a penas de 20ppm de concentración de extracto con respecto a 100ppm utilizados en el estudio in vitro de la actividades antioxidante y fotoprotectores de los extractos secos de *Passiflora mollissima* (De Oliveira, et al., 2013, pp. 122-127).

Además, si comparamos con recientes estudios realizados por espectrofotometría ultravioleta los FPS de diferentes marcas comerciales van de 8-30 (Hojerová et al., 2011, pp. 32-36); (Abreu et al., 2004, p. 383) (ver Anexo K) correlacionando con nuestros datos los SPF de subextractos hexánico, clorofórmico y con acetato de etilo se encuentran a la par como fotoprotectores incluso a baja concentración.

El SPF es una medida cuantitativa de la eficacia fotoprotectora garantizando que la *Passiflora manicata* presenta metabolitos que absorben, dispersan o bloquean altamente la radiación UV-B.

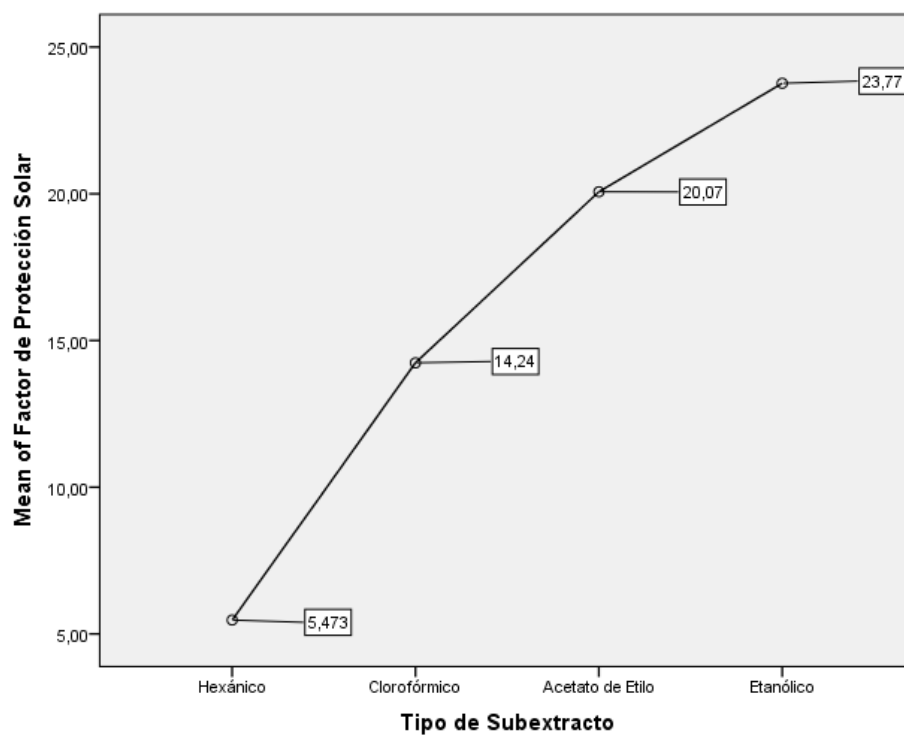


Figura 5-3: Diagrama de Comparativo Medias (SPF) \pm DE.

Fuente: IBM SPSS Statistics Versión 23.0.0.0 (2015), 2015.

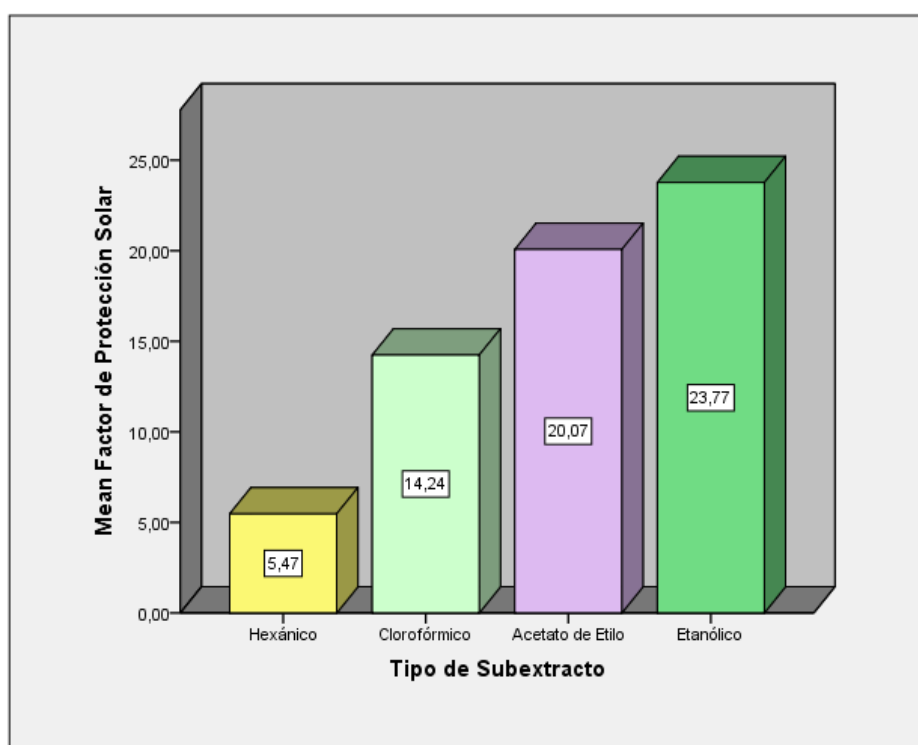


Figura 6-3: Histograma de los subextractos.

Fuente: IBM SPSS Statistics Versión 23.0.0.0 (2015), 2015.

3.1.11. Efecto protector contra la radiación UV-B de la muerte celular inducida

El efecto protector contra los rayos UV-B de la muerte celular inducida se evaluaron usando *Escherichia coli* (ATCC 25922) como un modelo de células y se utilizó una lámpara de radiación UV-B (Philips, Broadband TL 40w/12 RS).

Los resultados obtenidos son representativos debido a que todos los subextractos presentaron actividad fotoprotectora en comparación con el control negativo para cada uno y lo más importante que fueron capaces presentar similar y mayor actividad en cuanto a los controles positivos sobre todo en los subextractos acetato de etilo y etanólico.

los resultados arrojados por el ensayo fueron para el subextracto hexánico y clorofórmico la muerte celular sucedió de entre 60-180 minutos, en el subextracto con acetato de etilo la muerte celular disminuye por más tiempo con ocurriendo de entre 150 a 210 minutos y por último con el subextracto etanólico la muerte celular inducida logró disminuirse por muchísimo más tiempo alcanzando la cúspide de entre 150-240 minutos comprobándose de esta manera que los metabolitos presentes en la *Passiflora manicata* son altamente fotoprotectores (ver Tablas 15-3 a 19-3.).

Es importante destacar que los controles positivos alcanzaron su declive fotoprotector de entre 120-180 minutos siendo mejor el OMC (octil-metoxicinamato) en cuanto tiempo de protección, mientras que el Pamidato- O su efectividad máxima de fotoprotección radica en la primera hora de exposición a la radiación UV-B.

Existe una relación significativa en cuanto al tiempo máximo de protección contra UV-B y se debe a que la concentración de Fenoles y Flavonoides Totales que varían situándose la mayor concentración de los mismos en el subextracto etanólico, incrementando su actividad fotoprotectora del vegetal, (Gilaberte et al., 2003, p. 277); “a los compuestos fenólicos y flavonoides se les atribuye una importante acción en la estabilización de la oxidación lipídica tanto que han sido asociados con la capacidad atrapadora de radicales libres y se ha sugerido que tienen efecto inhibitorio sobre la mutagénesis y la carcinogénesis” (Valenzuela et al., 2014, pp. 19-20), lo cual pudo ser un factor determinante para la protección de la cepa de *Escherichia coli*.

3.2. Pruebas de hipótesis.

3.2.1. Los extractos de *Passiflora manicata* contienen compuestos fenólicos y flavonoides.

Se comprobó cualitativamente y cuantitativamente presentando alta evidencia de la presencia de estos metabolitos, lo que se puede corroborar en las siguientes tablas (ver Tabla 8-3.) (ver Anexo L).

Tabla 8-3: Concentración de Fenoles y Flavonoides Totales.

MUESTRA	PT mgEAG/g \pm DE	FT mgEAQ/g \pm DE
Subextracto Hexánico	7,53 \pm 0,13	5,24 \pm 0,09
Subextracto Clorofórmico	8,45 \pm 0,08	6,03 \pm 0,11
Subextracto Acetato de Etilo	12,78 \pm 0,15	9,67 \pm 0,17
Subextracto Etanólico	14,21 \pm 0,19	11,96 \pm 0,07
PT mgEAG/g: Fenoles Totales en mg de Equivalentes de Ácido Gálico por gramo de extracto seco.		
FT mgEQ/g: Flavonoides Totales en mg de Equivalentes de Quercetina por gramo de extracto seco.		
Valores de las medias \pm Desviación Estándar (n=3)		

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.2.1. Los extractos de *Passiflora manicata* presentan un factor de protección solar (SPF) in vitro mayor al factor mínimo de protección solar.

Mediante espectrofotometría se determinó los siguientes factores de protección solar los cuales superan por mucho el valor mínimo según COLIPA (ver Tablas 3-1, 9-3.) (ver Anexo J):

Tabla 9-3: Valores de SPF de los diferentes extractos de *Passiflora manicata*.

SUBEXTRACTOS:	Hexánico	Clorofórmico	Acetato de Etilo	Etanólico
SPF \pm DE:	5,47 \pm 0,0085	14,24 \pm 0,0041	20,07 \pm 0,0085	23,76 \pm 0,0065

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.2.3. Los extractos de *Passiflora manicata* otorgan fotoprotección a cepa de *Escherichia coli* de la radiación UV-B.

Los metabolitos de la planta protegieron de manera prolongada a la cepa de *Escherichia coli* y se puede constatar en los siguientes (ver Tablas 15-3 a 19-3.) (ver Figuras 7-3 a 15-3.) (ver Anexo K).

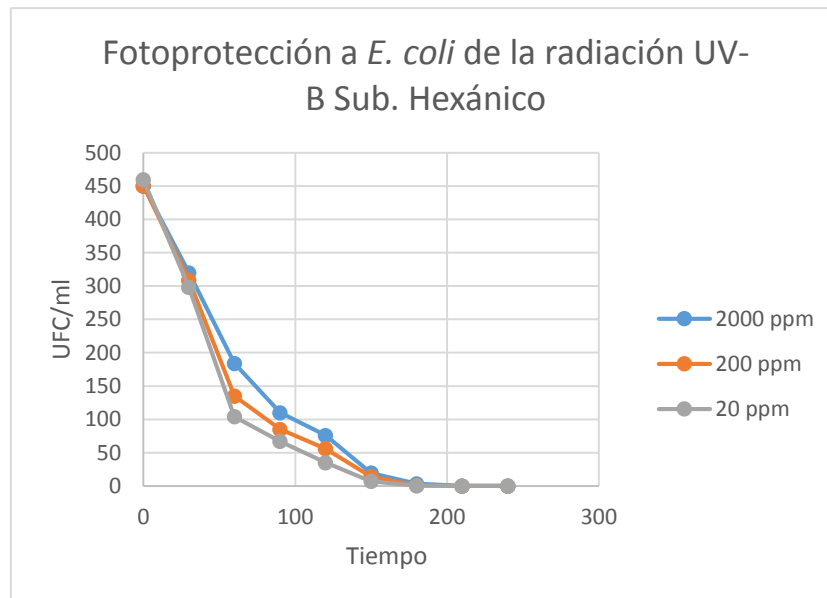


Figura 7-3: Fotoprotección celular del subextracto hexánico.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

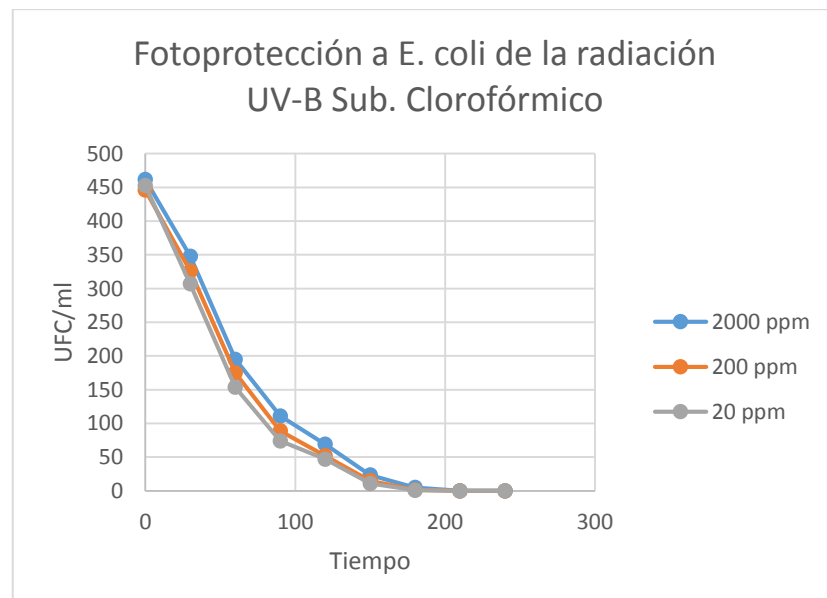


Figura 8-3: Fotoprotección celular del subextracto clorofórmico.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

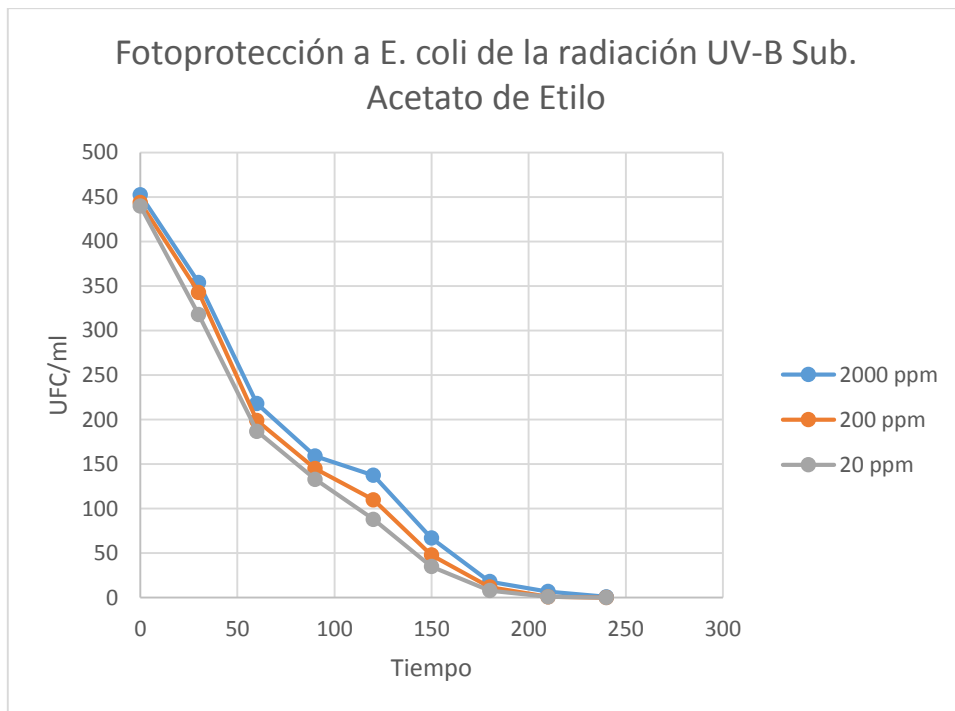


Figura 9-3: Fotoprotección celular del subextracto con acetato de etilo.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

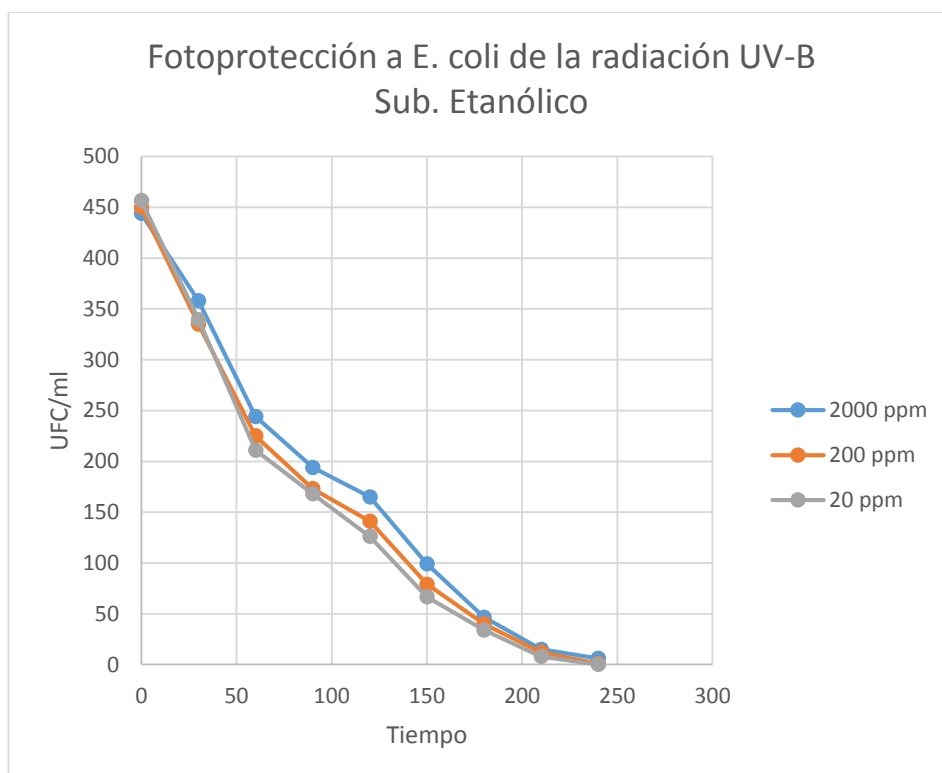


Figura 10-3: Fotoprotección celular del subextracto etanólico.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.3. Presentación de resultados.

3.3.1. Determinación del Contenido de Humedad.

Tabla 1-3: Resultados de la Humedad \pm DE.

% DE HUMEDAD	LÍMITE FARMACOPEA ESPAÑOLA.
12,45 \pm 0,06	14%

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.3.2. Determinación de Cenizas Totales.

Tabla 2-3: Resultados de Cenizas Totales \pm DE.

BASE HIDRATADA	BASE ANHIDRA	LÍMITE FARMACOPEA ESPAÑOLA
1,74 \pm 0,14	1,93 \pm 0,16	5%

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.3.3. Determinación de Cenizas Solubles en Agua.

Tabla 3-3: Resultados de Cenizas Solubles en Agua \pm DE.

BASE HIDRATADA	BASE ANHIDRA	LÍMITE FARMACOPEA ESPAÑOLA
0,89 \pm 0,18	0,99 \pm 0,2	2%

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.3.4. Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico.

Tabla 4-3: Resultados de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico en Agua \pm DE.

BASE HIDRATADA	BASE ANHIDRA	LÍMITE FARMACOPEA ESPAÑOLA
0,15 \pm 0,02	0,21 \pm 0,02	1%

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.3.5. Screening Fitoquímico.

Tabla 5-3: Resultados del Screening Fitoquímico.

METABOLITOS	ENSAYO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	HIDRO-	EXTRACTO ACUOSO
Alcaloides	Dragendorff	-	-		-
	Wagner	-	-		-
	Mayer	-	-		-
Lactonas y Cumarinas	Baljet	-	+++		
Triterpenos y Esteroides	Lieberman- Buchard	++	+		
Aceites y Grasas	Sudan III	++			
Resinas	Resinas		-		
Azucres Reductores	Fehling		+++		+++
Saponinas	Espuma		-		+
Fenoles y Taninos	FeCl ₃		+++ Coloración verde intensa		+++ Coloración verde intensa
Quinonas	Borntrager		-		
Flavonoides	Shinoda		+++ Coloración roja		+ Coloración amarilla
Mucilagos	Mucilagos				-
Catequinas	Catequinas		-		
Antocianidina	Antocianidina		+++		
Interpretación:					
Negativo (-)					
Posible presencia del metabolito (+)					

Moderada presencia del metabolito (++)

Alta presencia del metabolito (+++)

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.3.6. Rendimiento y Cantidad de los Subextractos de *Passiflora manicata*.

Tabla 6-3: Resultados del rendimiento de los subextractos objeto de estudio.

SUBEXTRACTOS				
	Hexánico	Clorofórmico	Acetato de Etilo	Etanol
P1	118,4780	108,0011	148,5401	144,5210
P2	118,6601	108,3306	148,7401	144,7180
CS	0,182	0,330	0,200	0,197
P	50			
R	0,36	0,66	0,40	0,39
Interpretación:				
P1: Peso del Balón Tarado (g)				
P2: Peso Balón + Subextracto (g)				
CS: Cantidad del Subextracto (g) (P2- P1)				
P: Peso del vegetal <i>Passiflora manicata</i> (g)				
R: % de Rendimiento				
ExEtOH: Extracto Etanólico al 96%.				

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.3.7. Análisis Cualitativo de los Grupos Fitoquímicos por TLC (Cromatografía en Capa Fina).

Tabla 8-3: Resultados del perfil cromatográfico visto por UV.

SUBEXTRACTOS (Hexánico, Clorofórmico, Acetato de etilo y Etanólico)



254nm

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.3.8. Determinación del contenido de Fenoles Totales.

Tabla 9-3: Resultados de la concentración de Fenoles Totales.

MUESTRA	PT mgEAG/g \pm DE
Subextracto Hexánico	7,53 \pm 0,13
Subextracto Clorofórmico	8,45 \pm 0,08
Subextracto Acetato de Etilo	12,78 \pm 0,15
Subextracto Etanólico	14,21 \pm 0,19
PT mgEAG/g: Fenoles Totales en mg de Equivalentes de Ácido Gálico por gramo de extracto seco.	
Valores de las medias \pm Desviación Estándar (n=3)	

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

3.3.9. Determinación del contenido de Flavonoides Totales.

Tabla 10-3: Resultados de la concentración de Flavonoides Totales.

MUESTRA	FT mgEAQ/g \pm DE
Subextracto Hexánico	5,24 \pm 0,09
Subextracto Clorofórmico	6,03 \pm 0,11
Subextracto Acetato de Etilo	9,67 \pm 0,17
Subextracto Etanólico	11,96 \pm 0,07
FT mgEQ/g: Flavonoides Totales en mg de Equivalentes de Quercetina por gramo de extracto seco.	
Valores de las medias \pm Desviación Estándar (n=3)	
Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.	

3.3.10. Determinación del Factor de Protección Solar (SPF) in vitro.

Tabla 11-3: Resultados del SPF otorgado por el subextracto hexánico.

FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR <i>IN VITRO</i> DEL SUBEXTRACTO HEXÁNICO (20ppm)									
Nº	(λ) nm	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	X ± DE		EE x I	SPF ± DE	
1	290	0,475	0,473	0,474	0,474	± 0,0010	0,0150	0,071	± 0,0001
2	295	0,492	0,492	0,493	0,492	± 0,0006	0,0817	0,402	± 0,0005
3	300	0,539	0,541	0,540	0,540	± 0,0010	0,2874	1,552	± 0,0029
4	305	0,560	0,560	0,560	0,560	± 0,0000	0,3278	1,836	± 0,0000
5	310	0,575	0,574	0,578	0,576	± 0,0021	0,1864	1,073	± 0,0039
6	315	0,559	0,539	0,529	0,542	± 0,0152	0,0839	0,455	± 0,0128
7	320	0,501	0,502	0,501	0,501	± 0,0006	0,0180	0,090	± 0,0001
Factor de protección solar (SPF)								5,479	± 0,0085
(λ) nm: Longitud de onda									
Abs.: Absorbancia									

X ± DE: Media ± Desviación Estándar
EE x I: La función del producto normalizado utilizado en el cálculo del SPF
SPF: Factor de Protección Solar
Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

Tabla 12-3: Resultados del SPF otorgado por el subextracto clorofórmico.

FACTOR PROTECCIÓN SOLAR <i>IN VITRO</i> SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO (20ppm)									
N°	(λ) nm	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3		X ± DE	EE x I	SPF ± DE	
1	290	1,118	1,179	1,180	1,159	± 0,0355	0,0150	0,174	± 0,0053
2	295	1,313	1,311	1,310	1,311	± 0,0015	0,0817	1,071	± 0,0012
3	300	1,420	1,417	1,418	1,418	± 0,0015	0,2874	4,076	± 0,0044
4	305	1,495	1,496	1,497	1,496	± 0,0010	0,3278	4,904	± 0,0033
5	310	1,432	1,432	1,438	1,434	± 0,0035	0,1864	2,673	± 0,0065
6	315	1,340	1,341	1,339	1,340	± 0,0010	0,0839	1,124	± 0,0008
7	320	1,210	1,210	1,209	1,210	± 0,0006	0,0180	0,218	± 0,0001
Factor de protección solar (SPF)								14,240	± 0,0041

(λ) nm: Longitud de onda

Abs.: Absorbancia

X ± DE: Media ± Desviación Estándar

EE x I: La función del producto normalizado utilizado en el cálculo del SPF

SPF: Factor de Protección Solar

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

Tabla 13-3: Resultados del SPF otorgado por el subextracto con acetato de etilo.

FACTOR PROTECCIÓN SOLAR <i>IN VITRO</i> SUBEXTRACTO ACETATO ETILO (20ppm)									
N°	(λ) nm	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	X \pm DE	EE x I	FPS \pm DE		
1	290	1,724	1,725	1,725	1,725	$\pm 0,0006$	0,0150	0,259	$\pm 0,0001$
2	295	1,868	1,894	1,895	1,886	$\pm 0,0153$	0,0817	1,541	$\pm 0,0125$
3	300	1,933	1,933	1,934	1,933	$\pm 0,0006$	0,2874	5,556	$\pm 0,0017$
4	305	2,133	2,132	2,130	2,132	$\pm 0,0015$	0,3278	6,988	$\pm 0,0050$
5	310	2,028	2,027	2,025	2,027	$\pm 0,0015$	0,1864	3,778	$\pm 0,0028$
6	315	1,918	1,922	1,920	1,920	$\pm 0,0020$	0,0839	1,611	$\pm 0,0017$
7	320	1,865	1,862	1,860	1,862	$\pm 0,0025$	0,0180	0,335	$\pm 0,0005$
Factor de protección solar (SPF)								20,067	$\pm 0,0085$
(λ) nm: Longitud de onda									
Abs.: Absorbancia									
X \pm DE: Media \pm Desviación Estándar									
EE x I: La función del producto normalizado utilizado en el cálculo del SPF									
SPF: Factor de Protección Solar									
Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.									

Tabla 14-3: Resultados del SPF otorgado por el subextracto etanólico.

FACTOR PROTECCIÓN SOLAR <i>IN VITRO</i> DEL SUBEXTRACTO ETANÓLICO (20ppm)									
N°	(λ) nm	Abs. 1	Abs. 2	Abs. 3	X ± DE	EExI	FPS ± DE		
1	290	1,914	1,915	1,915	1,915	± 0,0006	0,0150	0,287	± 0,0001
2	295	2,084	2,082	2,083	2,083	± 0,0010	0,0817	1,702	± 0,0008
3	300	2,220	2,223	2,219	2,221	± 0,0021	0,2874	6,382	± 0,0060
4	305	2,520	2,520	2,521	2,520	± 0,0006	0,3278	8,262	± 0,0019
5	310	2,517	2,519	2,515	2,517	± 0,0020	0,1864	4,692	± 0,0037
6	315	2,416	2,418	2,416	2,417	± 0,0012	0,0839	2,028	± 0,0010
7	320	2,259	2,260	2,261	2,260	± 0,0010	0,0180	0,407	± 0,0002
Factor de protección solar (SPF)								23,759	± 0,0065
(λ) nm: Longitud de onda									
Abs.: Absorbancia									
X ± DE: Media ± Desviación Estándar									
EExI: La función del producto normalizado utilizado en el cálculo del SPF									
SPF: Factor de Protección Solar									
Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.									

3.3.11. Efecto protector contra la radiación UV-B de la muerte celular inducida.

Tabla 15-3: Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subextracto hexánico.

Tiempo	# UFC/ml Sub. Hexánico	# UFC/ml (ESTANDAR 1)	# UFC/ml (ESTANDAR 2)
	2000 ppm	2000 ppm	2000 ppm
0	450	433	442
30	320	349	362
60	184	245	250
90	110	184	160
120	76	122	89
150	20	33	22
180	4	12	6
210	0	3	0
240	0	0	0

ESTANDAR 1: (OMC) Octil-metoxicinamato

ESTANDAR 2: Palmidato-O

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

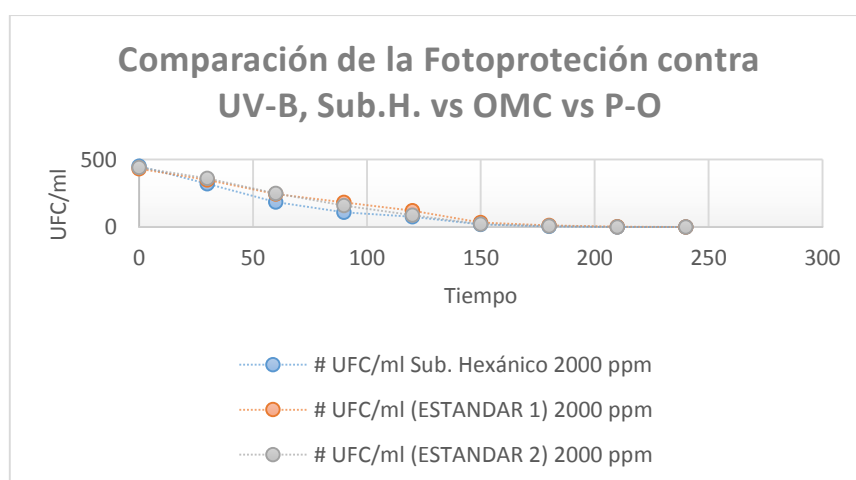


Figura 11-3: Comparativa del subextracto hexánico vs (ESTÁNDAR 1 y 2) a 2000 ppm.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

Tabla 16-3: Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subext. Clorofórmico.

Tiempo	# UFC/ml Sub. Clorofórm.	# UFC/ml (ESTANDAR 1)	# UFC/ml (ESTANDAR 2)
	2000 ppm	2000 ppm	2000 ppm
0	462	433	442
30	348	349	362
60	195	245	250
90	111	184	160
120	69	122	89
150	24	33	22
180	5	12	6
210	0	3	0
240	0	0	0

ESTANDAR 1: (OMC) Octil-metoxicinamato

ESTANDAR 2: Palmidato-O

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

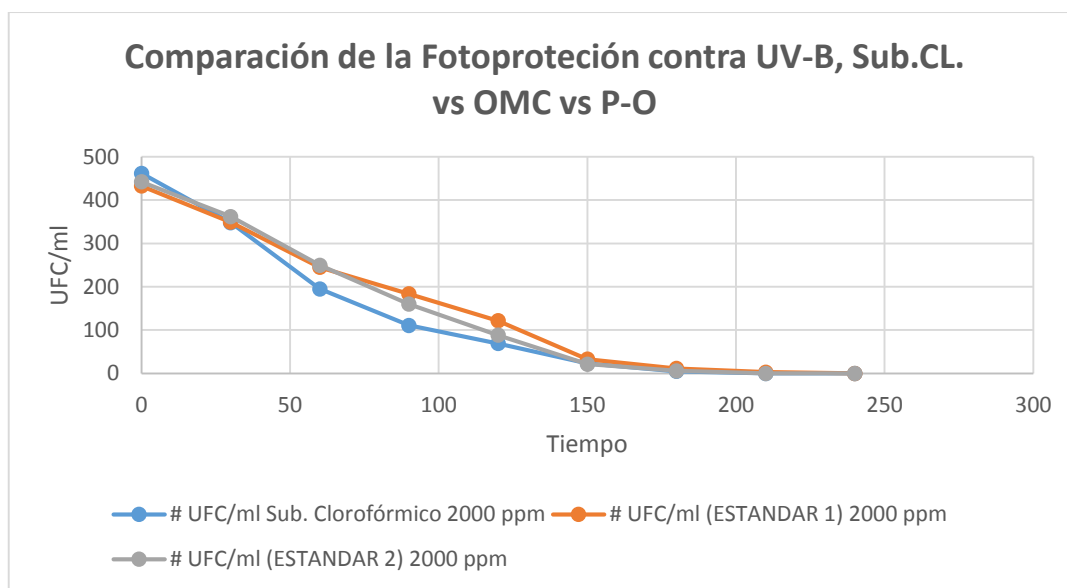


Figura 12-3: Comparativa del subextracto clorofórmico vs (ESTÁNDAR 1 y 2) a 2000 ppm.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

Tabla 17-3: Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subext. Acetato de etilo.

	# UFC/ml Sub. Acet.Et.	# UFC/ml (ESTANDAR 1)	# UFC/ml (ESTANDAR 2)
Tiempo	2000 ppm	2000 ppm	2000 ppm
0	453	433	442
30	354	349	362
60	218	245	250
90	159	184	160
120	138	122	89
150	67	33	22
180	18	12	6
210	7	3	0
240	1	0	0
ESTANDAR 1: (OMC) Octil-metoxicinamato			
ESTANDAR 2: Palmidato-O			

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

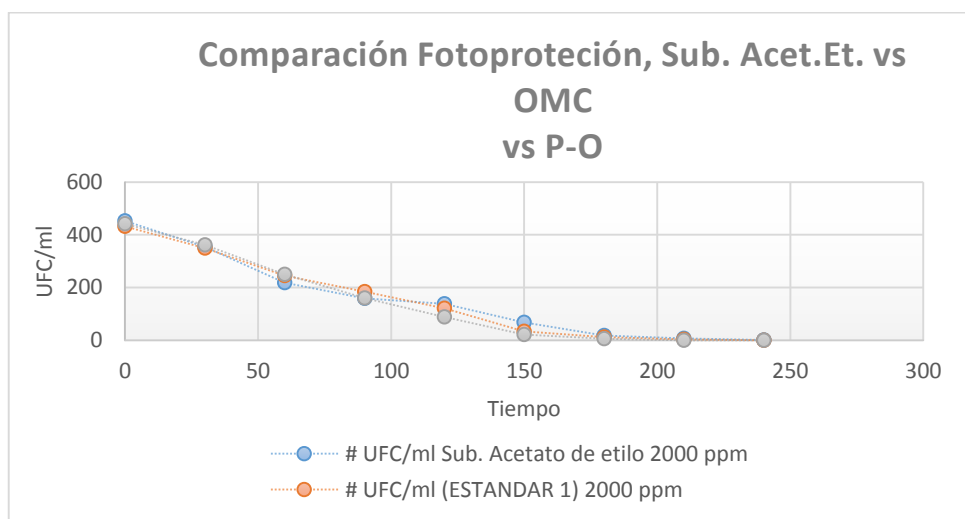


Figura 13-3: Comparativa del subextracto acetato de etilo vs (ESTÁNDAR 1 y 2) a 2000 ppm.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

Tabla 18-3: Efecto protector contra la radiación UV-B otorgada por el Subextracto etanólico.

Tiempo	# UFC/ml Sub. Etanólico	# UFC/ml (ESTANDAR 1)	# UFC/ml (ESTANDAR 2)
	2000 ppm	2000 ppm	2000 ppm
0	444	433	442
30	358	349	362
60	244	245	250
90	194	184	160
120	165	122	89
150	99	33	22
180	47	12	6
210	15	3	0
240	6	0	0

ESTANDAR 1: (OMC) Octil-metoxicinamato

ESTANDAR 2: Palmidato-O

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

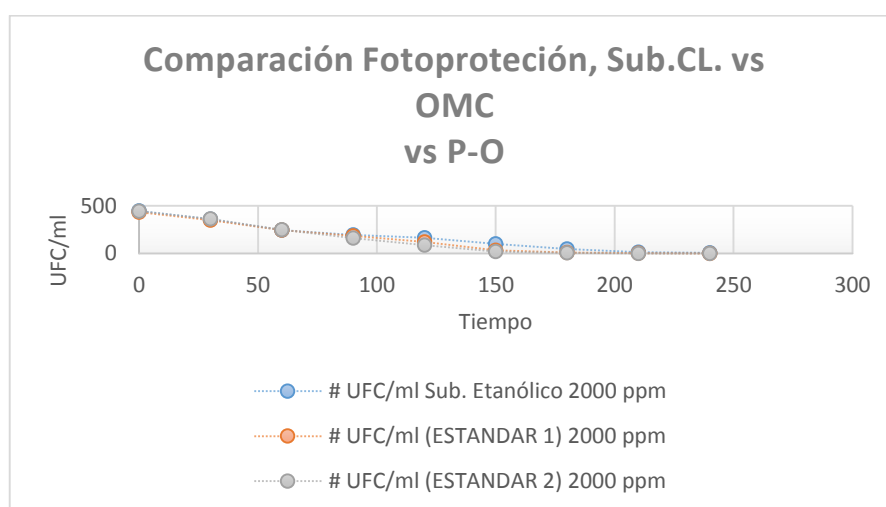


Figura 14-3: Comparativa del subextracto etanólico vs (ESTÁNDAR 1 y 2) a 2000 ppm.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

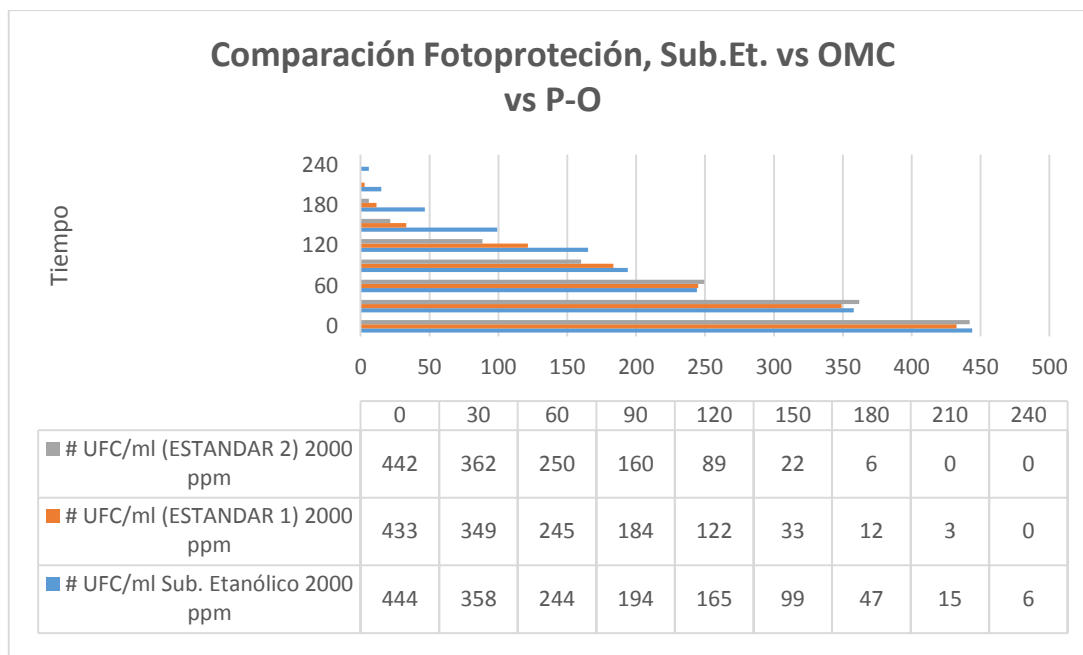


Figura 15-3: Comparativa del subextracto etanólico vs (ESTÁNDAR 1 y 2) a 2000 ppm.

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

Tabla 19-3: Controles negativos (Hexano, Cloroformo, Acetato de Etilo y Etanol).

Tiempo	Número de UFC/ml			
	Hexáno	Cloroformo	Acetato de Etilo	Etanol
0	447	448	437	441
30	135	139	160	151
60	1	0	1	1
90	0	0	0	0
120	0	0	0	0
150	0	0	0	0
180	0	0	0	0
210	0	0	0	0
240	0	0	0	0

Realizado por: Stalin Santamaría, 2015.

CONCLUSIONES

- ✓ Los extractos de la *Passiflora manicata* presentaron actividad fotoprotectora al irradiarse con UV-B, el subextracto etanólico a 2000 ppm concede mayor fotoprotección en relación a los demás subextractos y concentraciones.
- ✓ Se determinó la presencia de lactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides, grasas, azúcares reductores, saponinas, fenoles, taninos, flavonoides y antocinidinas mediante screening fitoquímico; cuantificación de fenoles totales con $14,21 \pm 0,19$ mgEAG/g de extracto y $11,96 \pm 0,07$ mgEQ/g de extracto partiendo de 100g de la droga cruda, los que se presume son responsables de la fotoprotección.
- ✓ Los compuestos fenólicos y flavonoides en colaboración con otros posibles metabolitos pudieron incidir en el factor de protección solar (SPF) in vitro obteniéndose un SPFSubextracto H.= $5,47 \pm 0,0085$; SPFSubextracto CL.= $14,24 \pm 0,0041$; SPFSubextracto Acet. Et.= $20,07 \pm 0,0085$ y SPFSubextracto ET. = $23,76 \pm 0,0065$, evidenciando la capacidad fotoprotectora a 20ppm. De acuerdo a los resultados obtenidos una mayor concentración de los subextractos de *Passiflora manicata* otorgará mayor SPF.
- ✓ Los subextractos de *Passiflora manicata* a 2000ppm presentaron actividad fotoprotectora en la muerte celular inducida a *Escherichia coli*, otorgándoles mayor tiempo de vida al ser irradiados con UV-B, con tiempo máximo de deceso 210-240 minutos para el subextracto etanólico siendo el más representativo, sin dejar de lado al de acetato, clorofórmico y hexánico manteniéndose al nivel del estándar octil-metoxicinamato y Pamidato-O.

RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda continuar con la investigación de *Passiflora manicata* a fin de determinar exactamente los metabolitos responsables de la actividad fotoprotectora e incluirlos en una formulación farmacéutica o cosmeceútica.
- ✓ En caso de realizar el ensayo de fotoprotección por muerte inducida con *Escherichia coli* se recomienda usar un asa calibrada de 0,5 uL para cultivar las bacterias en el agar.
- ✓ Se recomienda tramitar el permiso del Ministerio del Ambiente para recolección de la droga cruda a fin de que no ocurra inconvenientes al publicar la tesis o continuar con el estudio de la misma en el exterior.
- ✓ Promover con la investigación científica sobre las planta nativas del país pues muchas de ellas contienen grandes propiedades medicinales que necesitan determinarse, fomentándose de esta manera el conocimiento ancestral y contribuyendo a la investigación científica que a nuestro país le hace tanta falta.
- ✓ Difundir los conocimientos adquiridos, especialmente fomentar la importancia que tiene el uso de los protectores solares para nuestra salud pues los casos de cáncer de piel va en auge.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ABREU DUTRA, E.; et al.** “*Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry*”. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* [en línea], 2004, (Brasil) 40(3), p. 383. [Consulta: 05 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n3/14.pdf>
2. **AGUILAR, Z.; Ulloa, C. & HIDALGO, P.** *Guía de Plantas Útiles de los Páramos de Zuleta, Ecuador* [en línea]. Ecuador: Patricio Mena Vásquez, 2009. [Consulta: 07 Enero 2015]. Disponible en: http://www.ecociencia.org/archivos/guia_plantas-091128.pdf
3. **AMERICA SOCIETY CANCER.** *Cáncer de piel: células basales y células escamosas* [en línea]. USA: 2014. [Consulta: 18 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002321-pdf.pdf>
4. **FIGUEIREDO, Sônia et al.** *In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of Garcinia brasiliensis epicarp extract. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* [en línea], 2014, (Brasil) 131, p. 65. [Consulta: 18 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134414000050?np=y>
5. **ARAGADVAY, S.** *Elaboración y control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de chilca (Baccharis latifolia) y hierbamora (Solanum nigrum)*. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Chimborazo, Ecuador. 2009, pp 65-69. [Consulta: 18 Enero 2015]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/216/1/56T00190.pdf>
6. **ASMA, A. & MOHAMMAD, H.** *Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds crude extracts of pigeon pea traditionally used in Oman for the treatment of several chronic diseases. Asian Pacific Journal of Tropical Disease* [en línea], 2015, (Sultanate of Oman) 5(4), pp. 318-319. [Consulta: 18 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2222180814607908>
7. **AVILA ACEVEDO, J. G. et al.** *Photoprotective activity of Buddleja scordioides. Fitoterapia* [en línea], 2005, (México) 76, pp. 301-309. [Consulta: 18 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X05000535>
8. **BREWER, M.** *Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [en línea],

2011, (USA) 10, pp. 221-227. [Consulta: 19 Enero 2015]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x/abstract>

9. CAZORLA MARTÍNEZ, M. P. *Actividad fotoprotectora de la maracuyá (Passiflora edulis), Ishpingo (Ocotea quixos) en fototipos III (Homo sapiens) para elaboración de un protector solar.* Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Chimborazo, Ecuador. 2013, pp 17-34. [Consulta: 19 Enero 2015]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3498/1/236T0102%20UDCTFC.pdf>

10. CRUZ ATI, P. *Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla (Matricaria chamomilla), matico (Aristiguetia glutinosa) y marco (Ambrosia arborescens) para NEO-FÁRMACO.* Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Chimborazo, Ecuador. 2009, pp 65-84. [Consulta: 19 Enero 2015]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/218/1/56T00192.pdf>

12. DE ARGILA, D. et al. *Estudio de las fotodermatosis idiopáticas y exógenas. Parte I: fisiopatología y aspectos técnicos del estudio fotobiológico. ACTAS Dermo-Sifiliográficas* [en línea], 2012, (España) 105(3), pp. 1-3. 2012. [Consulta: 19 Enero 2015]. Disponible en: www.elsevier.es/es-revista---pdf-90277664-S300

13. DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K. K. & HAI LIU, R. *Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry* [en línea], 2002, (USA) 50, pp. 3010-3014. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: <http://ucanr.edu/datastoreFiles/608-418.pdf>

14. ENCYCLOPEDIA OF LIFE. *Halenia weddelliana* Gilg [en línea], USA: 2013. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: <http://eol.org/pages/6853614/details>

15. ENRÍQUEZ, A. M. et al. *Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de Zingiber officinale Roscoe "Jengibre" de la ciudad de Chanchamayo - Región Junín. Revista Médica Vallejana* [en línea], 2008, (Perú) 5(1), p. 57. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: <http://revistas.concytec.gob.pe/pdf/rmv/v5n1/a07v5n1.pdf>

16. ESTEVA, E. *Fotoprotección. Consejos, precauciones y productos solares. OFFARM* [en línea], 2005, (España) 24(5), p. 70. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet? f=10&pidet_articulo=13074469&pidet

usuario=0&pcontactid=&pident_revista=4&ty=151&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=4v24n05a13074469pdf001.pdf

17. FALEIRO NAVES, P. L. *Formación de biopelículas por Escherichia coli y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología II. Madrid, España. 2010, pp. 25-35. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/9780/1/T31422.pdf>

18. FLORES ALONSO, O. *Educación médica continua. El Sol y la piel. Fotodermatosis*. *Revista del Centro Dermatológico Pascua* [en línea], 2000, (México) 9(2), pp. 126-131. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derma/cd-2000/cd002l.pdf>

19. FREE AND OPEN ACCESS TO BIODIVERSITY DATA. *Halenia weddelliana* Gilg [En línea]. USA: 2013. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.gbif.org/species/131727904>

20. GAROLI, D. et al. *Sunscreen tests: Correspondence between in vitro data and values reported by the manufacturers*. *Journal of Dermatological Science* [en línea], 2008, (Italia) 52, pp. 193-204. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923181108002028>

21. GILABERTE, Y.; COSCOJUELA, C.; SÁENZ, C. & GONZÁLEZ, S. *Fotoprotección*. *Actas Dermo-Sifiliográficas* [en línea], 2003, (USA) 94(5), p. 277. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.actasdermo.org/es/fotoproteccion/articulo/13048173/>

22. GOLDSMITH, Lowell et al. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 8va ed. New York-USA, 2012, The McGraw-Hill Companies, Inc., pp. 1031-1039.

23. GONÇALVES DE OLIVEIRA, R. J. et al. *In vitro antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from Neoglaziovia variegata (Bromeliaceae)*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* [en línea], 2013, (Brasil) 3(1), pp. 122-127. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3812888/>

24. GONÇALVES DE OLIVEIRA, R. J. et al. *Dried extracts of Encholirium spectabile (Bromeliaceae) present antioxidant and photoprotective activities in vitro*. *Journal of Young Pharmacists* [en línea], 2013, (Brasil) 5, p. 102. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S097514831300040X>

- 25. GUADARRAMA GONZÁLEZ, P.** *Fundamentos filosóficos y epistemológicos de la investigación.* Centro de Estudios Miguel Enriquez [en línea], 2008, (Brasil) pp. 1-2. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: http://www.archivochile.com/Ideas_Autores/guadarramapg/guadarramapg00012.pdf
- 26. GUALLI ADAS, A. E.; ARIAS ARIAS, R. V. & MANZANO SANTANA, P.** *Estudio Comparativo del Té de la especie (Ilex guayusa) procedente de la Región Amazónica y el producto comercial de la empresa "Aromas del Tungurahua".* Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Mecánica y Ciencia de la Producción. Guayaquil, Ecuador. 2012, pp. 1-5. [Consulta: 20 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/24391/1/Paper%20tesis%20adraian a.%20segunda%20revisi%C3%B3n%20Dra%20Manzano.pdf>
- 27. GUERRERO, David.** *Actividad hipoglucemiante del extracto de las hojas de Oreocallis grandiflora en ratas (Rattus norvegicus) por inhibición de alfa-amilasa.* Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Chimborazo, Ecuador. 2014, pp 22-28, 31-39. [Consulta: 21 Enero 2015]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3428/1/56T00447.pdf>
- 28. GUTIÉRREZ VIDRIO, R. M.** *Cáncer de piel.* Revista de la Facultad de Medicina UNAM [en línea], 2003, (México) 46(4), p. 166-171. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2003/un0341.pdf>
- 29. HOJEROVÁ, J.; MEDOVČÍKOVÁ, A. & MIKULA, M.** *Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight.* International Journal of Pharmaceutics [en línea], 2011, (Eslovaquia) 408(1-2), pp. 32-36. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517311000718>
- 30. HUANG, B. et al.** *Extracts of Halenia elliptica exhibit antioxidant properties in vitro and in vivo.* Food and Chemical Toxicology [en línea], 2011, (China) 49(1), pp. 185-190. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510006277>
- 31. HUPEL, M.; POUPART, N. & ARGALL, E.** *Development of a new in vitro method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation.* Talanta [en línea], 2011, (Francia) 86, pp. 362-364. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011008344>

- 32. KROL, W. et al.** *Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components.* *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 1996, (Israel) 55(1), pp. 19-25. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874196014663>
- 33. MEI, Y. et al.** *Phytochemical profiles, antioxidant activities of functional herb *Abrus cantoniensis* and *Abrus mollis*.* *Food Chemistry* [en línea], 2015, (China) 177, p. 307. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615000564>
- 34. MÉNDEZ FLORES, Avilio.** *Escherichia coli* [blog]. [Consulta: 23 Enero 2015]. Disponible en: <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/1373>
- 35. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA.** *Tasa de mortalidad en el Ecuador producto del cáncer* [En línea]. Ecuador: MSP, 2013. [Consulta: 07 Enero 2015]. Disponible en: <http://instituciones.msp.gob.ec/somossalud/index.php/enterate/200-el-30-a-40-decasos-de-cancer-podrian-evitarse-si-se-cambian-cinco-malos-habitos>
- 36. MIRANDA MARTÍNEZ, M. & CUÉLLAR CUÉLLAR, A.** *Farmacognosia y productos naturales.* ed. Habana-Cuba, 2001, Félix Varela, pp. 141, 207, 291-292.
- 37. OCHOA PACHECO, A. et al.** *Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana.* *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [en línea], 2013, (México) 44(1), p. 57. [Consulta: 25 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57929946007.pdf>
- 38. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** *Cánceres de origen ambiental y ocupacional* [en línea]. USA: Nota descriptiva N°350, 2011. [Consulta: 25 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs350/es/>
- 39. ORDOÑEZ, A.; GOMEZ, J.; VATTUONE, M. & LSLA, M.** *Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts.* *Food Chemistry* [en línea], 2006, (Argentina) 97(3), p. 454. [Consulta: 25 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605003997>
- 40. PARDO ZAPATA, J.** *Patentabilidad de los extractos vegetales* [En línea]. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: http://www.ub.edu/centredepateints/pdf/doc_dilluns_CP/pardo_patentesextractosplantas.pdf

41. PINEDO V., J. et al. *Spectral signature of ultraviolet solar irradiance in Zacatecas. Geofísica Internacional* [en línea], 2006, (México) 45(4), pp. 263-264. [Consulta: 24 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/geoint/v45n4/v45n4a5.pdf>

42. RODRIGUEZ, S. et al. Xanthones, Secoiridoids And Flavonoids From *Halenia corniculata*. *Phytochemistry* [en línea], 1995, (Mongolia) 40(4), pp. 1265-1272. [Consulta: 24 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229500402S>

43. SAYRE, R. M.; POH AGIN, P.; LE VEE, G. J. & MARLOWE, E. *A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. Photochemistry and Photobiology* [en línea], 1979, (USA) 29(3), pp. 559-566. [Consulta: 24 Enero 2015]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07090.x/abstract>

44. SECRETARÍA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO (SENPLADES). *Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017*. Quito-Ecuador: Fander Falconí, 2013, pp. 135- 152.

45. SHARAPIN, N. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. ed. Texas-USA, 2000, Convenio Andrés Bello, pp. 146-150

46. SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R. & LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. *Polyphenols and flavonoids. Methods in Enzymology*, 1999, (USA) 299, pp. 152-178. [Consulta: 24 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687999990171>

47. SOCIEDAD ARGENTINA DE DERMATOLOGÍA. *Manual De Cuidado Y Prevención* [en línea], 2012, (Argentina) pp. 2-7. [Consulta: 24 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.cancerdepiel.org.ar/manual/manual.pdf>

48. SOCIETY AMERICAN CANCER. 2014. *Ultraviolet (UV) Radiation* [en línea]. [Consulta: 21 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/radiationexposureandcancer/uvradiation/uvradiation>

49. SOLCA, Guayaquil. *Registro de Tumores* [en línea]. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.estadisticas.med.ec/webpages/reportes/Grafico1-1.jsp>

50. SOLCA, Quito. *Cáncer de piel* [en línea]. [Consulta: 22 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.solcaquito.org.ec/index.php/en/el-cancer/tipos-de-cancer/cancer-de-piel>

- 51. SUN, Y.; LIU, G.; HUANG, H. & YU, P.** *Chromone derivatives from Halenia elliptica and their anti-HBV activities. Phytochemistry* [en línea], 2012, (China) 75, pp. 169-176. [Consulta: 26 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942211004730>
- 52. THE EUROPEAN COSMETIC ASSOCIATION (COLIPA).** *Method for in vitro determination of UVA protection. Guideline* [en línea], 2009, (USA) pp. 2-13. [Consulta: 26 Enero 2015]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1468-2494.2009.00542.x/abstract>
- 53. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.** *Cromatografía En Placa Fina*, Madrid-España: s.n [en línea]. 2008, pp. 1-4. [Consulta: 26 Enero 2015]. Disponible en: <https://www.uam.es/docencia/jppid/documentos/practicas/actuales/guion-p6.pdf>
- 54. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID.** *Obtención De Extractos Y Esencias - OCW UPM* [en línea], 2004, pp. 1-13. [Consulta: 26 Enero 2015]. Disponible en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema12.pdf>
- 55. VIOLANTE P., I. M. et al.** *Avaliação in vitro da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. Brazilian Journal of Pharmacognosy* [en línea], 2009 (Brasil) 19(2A), pp. 252-253. [Consulta: 27 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v19n2a/a20v192a.pdf>
- 56. WAGNER, H. & BLADT, S.** *Plant Drug Analysis*. 2da ed. Munich, 1996, Springer, pp. 146, 147, 190, 191.
- 57. WOLFF, K. & ALLEN JOHNSON, R.** *F I Tzpatrick's Color Atlas And Synopsis Of Clinical Dermatology*. 6ta ed. New York, 2009, The McGraw-Hill Companies, pp. 232-244.
- 58. WU, S.-J. & LEAN-TEIK, N.** *Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (Momordica charantia Linn. var. abbreviata Ser.) in Taiwan. LWT* [en línea], 2008, (Taiwan) 41(2), p. 323-330. [Consulta: 29 Enero 2015]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643807001181>
- 59. ZUBELDIA, J. M.; BAEZA, M. L.; JÁUREGUI, I. & SENENT, C. J.** *Libro De Las Enfermedades Alérgicas De La Fundación BBVA*. ed. Bilbao, 2012, Editorial Nerea, S. A., pp. 207-213.

ANEXOS

Anexo A. Control de Calidad del vegetal

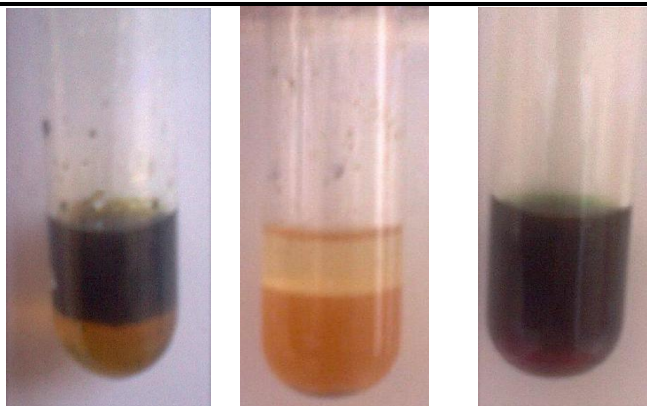


Cenizas Totales

Cenizas Solubles en Agua

Cenizas Solubles en Ácido Clorhídrico

Anexo B. Screening Fitoquímico



Shinoda

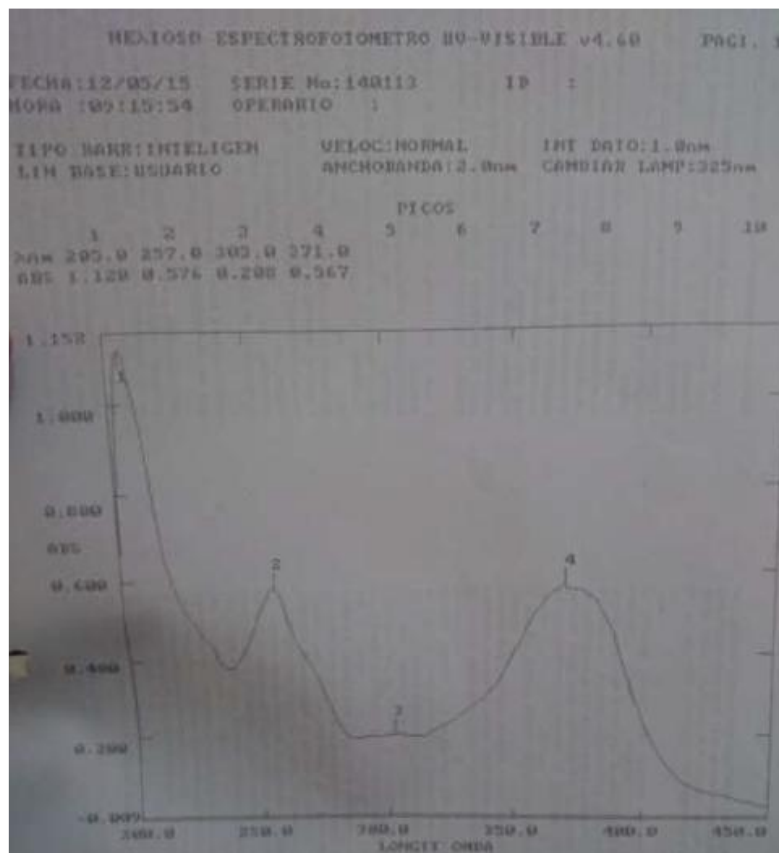
Antocianidinas

Cloruro Férrico

Anexo C. Absorbancias para curva de calibración del ácido gálico

HEXIOSB ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60				PAGI. 1
FECHA:07/05/15		SERIE No:140113		ID :
HORA :14:41:46		OPERARIO :		
SELEC. λ:SENCILLA		ANCHOBANDA:2.0nm		INTEGRACION:1s
CAMBIAR LAMP:325nm		TIEMP RETRASO:00:00		
LONG. ONDA:765.0nm				
MUESTRA	ABS	MUESTRA	ABS	
16	0.067			
17	0.067			
18	0.067			
19	0.101			
20	0.101			
21	0.101			
22	0.135			
23	0.135			
24	0.135			
25	0.172			
26	0.172			
27	0.172			
28	0.217			
29	0.218			
30	0.218			

Anexo D. Espectro de absorción para la curva de calibración de Quercetina



Anexo E. Absorbancias para curva de calibración de Quercetina

HEXIOSP ESPECTROFOTOMETRO UV-VISIBLE v4.60				PAGI. 1
FECHA:12/05/15	SERIE No:140113	ID :		
HORA :14:21:28	OPERARIO :			
SELEC. λ:SENCILLA	ANCHOBANDA:2.0nm	INTEGRACION:1s		
CAMBIAR LAMP:325nm	TIEMP RETRASO:00:00			
LONG. ONDA:257.0nm				
MUESTRA	ABS	MUESTRA	ABS	
1	0.265			
2	0.415			
3	0.627			
4	0.868			
5	1.070			

Anexo F. Análisis estadístico del SPF

Tests of Normality							
Tipo de Subextracto		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Factor de Protección Solar	Hexánico	,192	4		,971	4	,850
	Clorofórmico	,250	4		,945	4	,683
	Acetato de Etilo	,192	4		,971	4	,850
	Etanólico	,151	4		,993	4	,972

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances			
Factor de Protección Solar			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,857	3	12	,490

ANOVA

Factor de Protección Solar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	762,856	3	254,285	1245478,408	,000
Within Groups	,002	12	,000		
Total	762,858	15			

Descriptives

Factor de Protección Solar

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Hexánico	4	5,4725	,01708	,00854	5,4453	5,4997	5,45	5,49
Clorofórmico	4	14,2400	,00816	,00408	14,2270	14,2530	14,23	14,25
Acetato de Etilo	4	20,0675	,01708	,00854	20,0403	20,0947	20,05	20,09
Etanólico	4	23,7650	,01291	,00645	23,7445	23,7855	23,75	23,78
Total	16	15,8863	7,13142	1,78286	12,0862	19,6863	5,45	23,78

Multiple Comparisons

Dependent Variable:

(I) Tipo de Subextracto			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Hexánico	Clorofórmico	-8,76750 [*]	,01010	,000	-8,7975	-8,7375
		Acetato de Etilo	-14,59500 [*]	,01010	,000	-14,6250	-14,5650
		Etanólico	-18,29250 [*]	,01010	,000	-18,3225	-18,2625
	Clorofórmico	Hexánico	8,76750 [*]	,01010	,000	8,7375	8,7975
		Acetato de Etilo	-5,82750 [*]	,01010	,000	-5,8575	-5,7975
		Etanólico	-9,52500 [*]	,01010	,000	-9,5550	-9,4950
	Acetato de Etilo	Hexánico	14,59500 [*]	,01010	,000	14,5650	14,6250
		Clorofórmico	5,82750 [*]	,01010	,000	5,7975	5,8575
		Etanólico	-3,69750 [*]	,01010	,000	-3,7275	-3,6675
	Etanólico	Hexánico	18,29250 [*]	,01010	,000	18,2625	18,3225
		Clorofórmico	9,52500 [*]	,01010	,000	9,4950	9,5550
		Acetato de Etilo	3,69750 [*]	,01010	,000	3,6675	3,7275

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Anexo G. Estudio de Niveles de SPF *in vitro* en protectores solares comerciales

Commercial sample (function)	Active Ingredient	Amount (%)	Labeled SPF	Found SPF*
A (Emulsion for body)	benzophenone-3	4.0	15.00	16.24 ± 0.05
	octyl methoxycinnamate	7.5		
B (Emulsion for body)	benzophenone-3	3.0	15.00	15.35 ± 0.06
	octyl methoxycinnamate	8.0		
C (Emulsion for body)	benzophenone-3	2.8	15.00	14.90 ± 0.03
	octyl methoxycinnamate	6.8		
	titanium dioxide and alkylbenzoate	0.7		
D (Emulsion for body)	benzophenone-3	3.5	15.00	14.65 ± 0.04
	octyl methoxycinnamate	7.0		
	octyl salicylate	2.0		
	titanium dioxide	2.0		
E (Sunblock lotion)	benzophenone-3	2.1	8.00	12.20 ± 0.06
	octyl methoxycinnamate	5.7		
	titanium dioxide and alkylbenzoate	0.6		
F (Emulsion for body)	benzophenone-3	1.5	8.00	10.94 ± 0.04
	octyl methoxycinnamate	5.5		
	octyl salicylate	1.0		
	titanium dioxide	1.0		
G (Emulsion for body)	benzophenone-3	2.75	15.00	13.65 ± 0.04
	octyl methoxycinnamate	6.5		
	octyl salicylate	1.0		
	titanium dioxide	1.0		
H (Emulsion for body)	benzophenone-3	5.0	30.00	19.00 ± 0.07
	octyl methoxycinnamate	7.5		
	octyl salicylate	5.0		
I (Emulsion for body)	benzophenone-3 octyl methoxycinnamate; titanium dioxide and zinc oxide	Not specified	20.00	14.15 ± 0.04
J (Emulsion for face)	benzophenone-3 octyl methoxycinnamate octyl salicylate	Not specified	23.00	20.3 ± 0.05

* Experimental data obtained in this research. M = 6

Anexo H. Preparacion del Estandar Mc. Farland

Tabla 2 Preparación de los estándares de Mc Farland

Estándar Nº	Volumen (ml)		Equivalente en N° de bacterias/ml ($\times 10^8$)
	BaCl ₂ (1,175 %)	H ₂ SO ₄ (1 %)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

Anexo I. Cuantificación de flavonoides y fenoles totales



Determinación de Flavonoides Totales

Determinación de Fenoles Totales

extracto con acetato de etilo y Blanco

extracto con acetato de etilo y Blanco

Anexo J. Verificación de absorbancias para determinar SPF

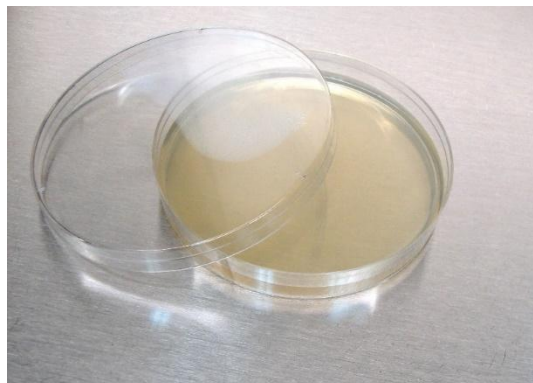


Espectrofotometría

Anexo K. Preparación de agar Mueller Hinton y cultivo de *Escherichia coli* a diferentes tiempos de irradiación UV-B



Preparación de medio de cultivo



Siembra de *Escherichia coli*.

Anexo L. *Escherichia coli* al cultivarse minutos después de irradiarse con UV-B, Estándar Pamidato-O (P-O) y Octilmetoxicinamato (OMC); Subextracto Hexánico (H), Clorofórmico (C) y con Acetato de etilo (Ac. E.)



Colonias *Escherichia coli*
luego de recibir 240 min de
radiación UV-B.

Colonias *Escherichia coli*
luego de recibir 180 min de
radiación UV-B

Colonias *Escherichia coli*
luego de recibir 120 min de
radiación UV-B
